

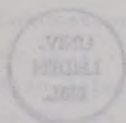
**Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung
und Struktur der Zellwand von
*Halococcus morrhuae***

Josef Steber

1976

Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung und
Struktur der Zellwand von Halococcus morrhuae

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt
von
Josef Steber
aus
Abensberg

Mai 1976

1. Berichterstatter: Prof.Dr.K.H.Schleifer
2. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Fiedler

Tag der Einreichung der Arbeit: 13. 5. 1976
Tag der Annahme der Arbeit: 21. 6. 1976
Tag der mündlichen Prüfung: 29. 6. 1976



Inhaltsverzeichnis

Seite:

A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	5
1. Organismen	5
2. Nährmedien	5
2.1. Flüssigkeitsmedium	5
2.2. Agar	5
3. Kulturbedingungen und Anzucht	6
4. Gewinnung der ZW	6
5. Herstellung wasserlöslicher ZW-Präparationen.	7
5.1. Solubilisierung der ZW mit Alkali	7
5.2. Solubilisierung der ZW mit NaOH/NaBH ₄	7
6. Verfahren zur Extraktion des ZW-Materials ...	7
6.1. Trichloressigsäure-Extraktion	7
6.2. Extraktion mit Glycin/HCl-Puffer pH 3.0	8
6.3. Extraktion mit Alkali	8
6.4. Extraktion von Mannan	8
6.5. Extraktion von pectinähnlichen Substanzen ...	9
6.6. Lipid-Extraktion	9
6.7. Behandlung der ZW mit Fluorwasserstoff	9
7. Enzymatische Behandlung des ZW-Polymers	9
7.1. Glycosidasen	9
7.2. Proteinasen	10
7.3. Weitere zur Inkubation von ZW-Material ver-	
wendete Enzyme	12
7.3.1. DNase- und RNase-Behandlung der ZW	12
7.3.2. Behandlung der ZW mit alkalischer Photphatase	12
8. Hydrolysebedingungen	12
8.1. Totalhydrolysen	12
8.1.1. Aminosucker und Aminosäuren	12
8.1.2. Neutralzucker	12
8.1.3. Uronsäuren	12
8.1.3.1. Hydrolyse zur präparativen Gewinnung der Uron-	
säuremonomeren	12
8.1.3.2. Hydrolyse für den gaschromatographischen	
Nachweis der Uronsäuren	13

8.1.3.2.	Hydrolyse der ZW zum papier- bzw. dünnschicht- chromatographischen Nachweis der Uronsäuren...	13
8.1.4.	Estergebundenes Sulfat und Gesamtacetat	13
8.1.5.	Bestimmung der Hydrolysenkinetik estergebunden- nen Sulfats in der ZW	14
8.2.	Partialhydrolysen	14
8.2.1.	Hydrolyse mit H_2SO_4	14
8.2.2.	Hydrolyse mit Oxalsäure	14
8.2.3.	Hydrolyse mit Trifluoressigsäure	15
8.2.4.	Partialhydrolyse zur Gewinnung Uronsäure-halti- ger Oligosaccharide	15
8.2.5.	Hydrolyse zum Nachweis von Oligopeptiden	15
9.	Papier- und Dünnschichtchromatographie bzw. Elektrophorese	16
9.1.	Laufmittelgemische, Puffergemische	16
9.2.	Durchführung	16
9.2.1.	Chromatographie	16
9.2.2.	Elektrophorese	17
9.3.	Anfärbetechniken zum papier- bzw. dünnschicht- chromatographischen Nachweis	18
9.3.1.	Aminozucker, Aminosäuren und Peptide	18
9.3.2.	Neutralzucker und Uronsäuren	18
9.3.2.1.	Anfärbung mit Silbernitrat/Alkali	18
9.3.2.2.	Anfärbung mit Anilinphthalat	18
9.3.2.3.	Nachweis für Uronsäurelactone und Ester	19
10.	Säulenchromatographie	19
10.1.	Gelfiltration	19
10.1.1.	Entsalzung mit Sephadex G-15	19
10.1.2.	Gelfiltration mit Biogel P-2	20
10.1.3.	Gelfiltration mit Sephadex G-100	20
10.1.4.	Gelfiltration mit Sephadex G-200	20
10.2.	Ionenaustausch-Chromatographie	20
10.2.1.	Ecteola-Cellulose	20
10.2.2.	DEAE-Cellulose	20
10.2.3.	DEAE-Sephadex	21
10.2.4.	Amberlite IRA-400	21
11.	Gaschromatographische Methoden	21
11.1.	Gaschromatographie von Alditolacetaten	21

11.1.1.	Neutralzucker und Polyole	21
11.1.2.	Nachweis der Uronsäuren als Alditolacetate...	22
11.2.	Gaschromatographie von Butylboronaten	23
12.	Quantitative Bestimmungsmethoden	24
12.1.	Aminozucker, Aminouronsäuren und Aminosäuren.	24
12.1.1.	Aminosäureanalysator	24
12.1.2.	Elson-Morgan-Test	24
12.1.3.	Morgan-Elson-Test	25
12.1.4.	Bestimmung des Aminozuckergehalts nach Dische and Borenfreund	25
12.1.5.	Quantitative Bestimmung der freien Amino- gruppen	27
12.2.	Neutralzucker	27
12.2.1.	Glucose- und Mannosebestimmung	27
12.2.2.	Galactose-Bestimmung	28
12.2.3.	Bestimmung von Galactose und Glucose neben- einander	28
12.3.	Gesamtgehalt an Uronsäuren	29
12.3.1.	m-Phenylphenol-Methode	29
12.3.2.	Carbazol-Methode	29
12.4.	Bestimmung der Gesamtzucker mit der Phenol- Methode	30
12.5.	Test auf reduzierende Gruppen (UV-Test)	31
12.6.	Quantitative Bestimmung von Acetat	31
12.6.1.	Bestimmung des Gesamtacetats	32
12.6.2.	Bestimmung estergebundener Acylgruppen	32
12.7.	Glycerinbestimmung	32
12.8.	Gesamtlipide	32
12.9.	Phosphatbestimmung	33
12.10.	Bestimmung von freiem anorganischen Sulfat ..	33
12.10.1.	Rhodizonat-Methode (Farbtest)	33
12.10.2.	Nephelometrische Methode	34
12.11.	Bestimmung des Trockengewichts	35
12.12.	Aschebestimmung	35
13.	Dinitrophenylierung	35
13.1.	Präparative Dinitrophenylierung von ZW	35
13.2.	Dinitrophenylierung von ZW für den dünn- schichtchromatographischen Nachweis	35

14.	Abbau von Aminohexosen mit Ninhydrin	36
15.	Acetylierung der freien Aminogruppen von Aminozuckern (N-Acetylierung)	36
15.1.	Präparative N-Acetylierung	36
15.2.	N-Acetylierung für analytische Zwecke	36
16.	Entfernung der N-Acetylgruppen (De-N-Acetylierung).....	36
16.1.	De-N-Acetylierung durch Alkalibehandlung	36
16.2.	De-N-Acetylierung durch Hydrazinolyse	37
16.2.1.	Herstellung von wasserfreiem Hydrazin	37
16.2.2.	Entfernung der N-Acetylgruppen mit Hydrazin ...	37
17.	Entfernung des estergebundenen Sulfats aus der Zellwand	37
17.1.	Desulfatisierung mit Pyridin in DMSO	37
17.2.	Desulfatisierung mit methanolischer HCl	38
17.2.1.	Herstellung von methanolischer HCl	38
17.2.2.	Desulfatisierung	38
18.	Reduktion der Uronsäuren zu den entsprechenden Neutralzuckern	38
18.1.	Reduktion der Carbodiimid-aktivierten Carboxylgruppen im ZW-Polymer	38
18.2.	Reduktion der Uronsäuren in Oligosacchariden mit NaBH_4 nach vorausgehender Lactonisierung	39
19.	Überführung der Uronsäurelactone in die freie Säureform	39
20.	Perjodatoxidation von ZW-Material	40
20.1.	Allgemeine Bedingungen	40
20.2.	Smith-Abbau	41
21.	Spezifische Zerlegung des ZW-Polymers in Spaltprodukte unterschiedlicher Größe	41
21.1.	Behandlung der ZW mit salpetriger Säure	41
21.2.	Auftrennung der Spaltprodukte durch Gelfiltration	41
22.	Fällung und Fraktionierung von solubilisierter ZW mit CTAB	42
23.	Methylierungsanalyse	43
23.1.	Elektrodialyse des ZW-Materials	43

23.2.	Methylierung der ZW-Präparationen	43
23.2.1.	Lösung der ZW in DMSO	43
23.2.2.	Herstellung des Methylsulfinyl-Carbanions	44
23.2.3.	Methylierung	44
23.2.4.	Isolierung des methylierten Polysaccharids	45
23.2.5.	Kontrolle des Methylierungsgrades durch IR-Spektroskopie	45
23.2.6.	Wiederholung der Methylierung	45
23.3.	Hydrolyse der permethylierten ZW-Präparationen.	45
23.4.	Reduktion und Acetylierung der partiell methylierten Zucker	46
23.5.	Analyse der Partiiell methylierten Alditolacetate	46
23.5.1.	Gaschromatographie	46
23.5.2.	Gaschromatographie kombiniert mit Massenspektrometrie (GC/MS)	46
23.5.3.	Auswertung der gaschromatographischen Ergebnisse	47
24.	Spektroskopische Methoden	47
24.1.	Bestimmung der optischen Drehung von Polysacchariden	47
24.2.	IR-Spektroskopie	47
24.2.1.	IR-Spektren von KBr-Presslingen	47
24.2.2.	IR-Spektren von Folien	47
25.	Bestimmung der anomeren Konfiguration von Zuckern durch CrO_3 -Oxidation	47
C.	Ergebnisse	49
1.	Zur Charakterisierung von Halococcus morrhuae..	49
1.1.	Wachstumsbedingungen und Morphologie	49
1.2.	Pigmente	50
1.3.	Verhalten gegenüber Antibiotica	52
2.	Chemische Zusammensetzung der ZW von Halococcus morrhuae	52
2.1.	Proteinanteil der ZW	52
2.2.	Kohlenhydrat-Zusammensetzung der ZW	54
2.2.1.	Neutralzucker	54
2.2.2.	Uronsäuren	55
2.2.2.1.	Identifizierung der Uronsäuren	55
2.2.2.2.	Quantitative Untersuchungen	55

2.2.2.3. Vorliegen der Uronsäure-Carboxylgruppen im ZW-Polymer	58
2.2.3. Aminozucker	58
2.2.3.1. Qualitative Zusammensetzung	58
2.2.3.2. Isolierung und Charakterisierung der Gulosamin- uronsäure	59
2.2.3.3. Quantitative Untersuchungen	61
2.2.3.4. Aminogruppensubstitution der Hexosamine	62
2.2.3.5. Vorliegen der Gulosaminuronsäure-Carboxyl- gruppen im ZW-Polymer	63
2.3. Anorganische Bestandteile der ZW	63
2.3.1. Sulfat	64
2.3.2. Phosphat	64
2.4. Chemische Zusammensetzung der wasserlöslichen ZW-Präparation von H.morrhuae	65
3. Zur strukturechemischen Klassifizierung der Halococcus-ZW	66
3.1. Versuche zur spezifischen Extraktion von Polymeren aus dem ZW-Material	67
3.1.1. Extraktionsmethoden mit Alkali	67
3.1.2. Extraktionen durch Säurebehandlung	67
3.1.2.1. Trichloressigsäure(TES)-Extraktion	67
3.1.2.2. Extraktion mit Glycin/HCl-Puffer pH 3.0	68
3.1.2.3. Extraktion von Pektinsubstanzen	68
3.1.2.4. Behandlung der ZW mit Fluorwasserstoff	69
3.2. Versuche zur enzymatischen Spaltung der ZW mit Hilfe von Exo- und Endoglycosidasen	70
3.3. Versuche zur chromatographischen Fraktionierung der Halococcus-ZW	70
3.3.1. Gelfiltration von wasserlöslicher ZW	70
3.3.2. Fraktionierung löslicher ZW mit Hilfe von Ecteola-Cellulose	70
3.4. Fraktionierung der ZW mit Hilfe quaternärer Ammoniumsalze	71
3.5. Bedeutung und Charakterisierung des Sulfat- anteils im Halococcus-ZW-Polymer	72
3.5.1. Komplexierung der ZW mit Cetavlon bei pH 1.8....	72

3.5.2.	Die Bindung der Sulfatgruppen im ZW-Polymer....	73
3.5.2.1.	Alkalistabilität der Sulfatbindung	73
3.5.2.2.	Säurelabilität der Sulfatbindung	73
3.5.2.3.	Hydrolysekinetik des ZW-Sulfatanteils	73
3.5.2.4.	Nachweis esterartig gebundener Sulfatgruppen durch IR-Spektroskopie	75
4.	Die Analyse von ZW-Fragmenten; Aussagen zur Struktur des ZW-Polymers und zur Position der estergebundenen Sulfatgruppen	76
4.1.	Fragmentierung der ZW durch Partialhydrolysen mit Oxalsäure	76
4.1.1.	Untersuchung eines Partialhydrolysats nach Be- handlung der ZW mit 0.5 m Oxalsäure	76
4.1.2.	Trennung der niedermolekularen sauren Fraktion eines ZW-Partialhydrolysats durch Anionenaus- tauscher	78
4.1.3.	Trennung, Isolierung und Charakterisierung eini- ger Oligosaccharide nach Oxalsäure-Hydrolyse der ZW	79
4.1.4.	Isolierung und Charakterisierung sulfatisier- ter Oligosaccharide aus ZW-Partialhydrolysaten	83
4.1.4.1.	Auftrennung des Partialhydrolysats durch Papier- elektrophorese bei pH 1.8	83
4.1.4.2.	Papierchromatographische Reinigung der Oligo- saccharide	85
4.1.4.3.	Analyse der isolierten Oligosaccharide	85
4.2.	ZW-Partialhydrolyse mit Schwefelsäure	89
4.3.	Spezifische Spaltung des ZW-Polysaccharids durch desaminativen Abbau	89
4.3.1.	Desaminative Spaltung einer partiell de-N-acety- lierten ZW-Präparation	90
4.3.1.1.	Gewinnung und Fraktionierung von ZW-Fragmenten.	90
4.3.1.2.	Untersuchungen an der polymeren Hauptfraktion 7-16	92
4.3.1.3.	Untersuchungen an niedermolekularen Oligosaccha- rid-Fractionen	93
4.3.2.	Desaminative Spaltung einer weitgehend de-N- acetylierten ZW-Präparation	95

4.3.2.1. Fraktionierung der ZW-Spaltprodukte nach Desaminierung	95
4.3.2.2. Fraktionierungsversuche an der polymeren Haupt- fraktion 10-20	98
4.3.2.3. Weitere Auftrennung der Oligosaccharid- fraktion 43-65	99
4.4. Zur Bindung der Aminozucker im ZW-Polymer.....	100
4.4.1. Isolierung und Charakterisierung von 2 ninhy- drin-positiven Aldobiuronsäuren	102
4.4.2. Hinweise für ein Disaccharid: Glucosamin → Galactose	105
5. Perjodat-Oxidation der Zellwand	107
5.1. Untersuchung Perjodat-behandelter ZW-Präpara- tionen	107
5.2. Smith-Abbau der Zellwand	113
6. Methylierungsanalyse der Zellwand	115
6.1. Methylierung der ZW-Präparationen	116
6.2. Gaschromatographische Analyse der partiell methylierten Alditolacetate	117
6.3. Massenspektrometrische Charakterisierung der partiell methylierten Alditolacetate	120
6.4. Identifizierung der partiell methylierten Aldi- tolacetate	122
6.5. Aussagen zur Struktur und Sulfat-Substitution der Zellwand	123
7. Zur anomeren Konfiguration der ZW-Zuckerkom- ponenten	126
D. Diskussion	128
E. Zusammenfassung	151
F. Literaturverzeichnis	154

Verwendete Abkürzungen:

ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Rinder serum-Albumin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid, Cetavlon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2.4-Dinitrophenyl-
Gal	Galactose
GalN	Galactosamin
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamin
GalUA	Galacturonsäure
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GlcUA	Glucuronsäure
Gly	Glycin
GulNUA	Gulosaminuronsäure
Man	Mannose
ManUA	Mannuronsäure
NAD	β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
RT	Raumtemperatur
TES	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
UA	Uronsäure
ZW	Zellwand

A. Einleitung

Eine der faszinierendsten Leistungen mikrobieller Organismen stellt die Lebensfähigkeit von Bakterien in gesättigten Salzlösungen dar. Aus diesem, von keiner anderen Organismengruppe besiedelten Biotop (Salzseen, "Salzgärten" zur NaCl-Gewinnung aus Meerwasser durch Verdunstung; salzkonserviertes, proteinreiches Material wie Fisch, Häute etc.), können extrem halophile Bakterien isoliert werden, die zur Familie der Halobacteriaceae zusammengefaßt werden (Bergeys Manual 1974). Morphologisch lassen sich die stäbchenförmigen Halobakterien (Gattung Halobacterium) von den Halokokken (Gattung Halococcus), die meist als Haufenkokken vorkommen, gut unterscheiden. Physiologisch sind alle Halobacteriaceen als obligat aerobe, primär Aminosäuren-verwertende Organismen charakterisiert, die zu ihrem Wachstum hohe Salzkonzentrationen ($> 2 \text{ m NaCl}$) benötigen und rote bis orangefarbene Kolonien bilden. Auch in der Basenzusammensetzung der Desoxyribonucleinsäure zeigen die extrem Halophilen eine gute Übereinstimmung; bei Organismen der Gattung Halobacterium wurden GC-Verhältnisse von 57-67 %, bei Halokokken von 60-66 % bestimmt (Kocur and Bohacek, 1972).

Für die Halobakterien ist schon eine geraume Zeit bekannt, daß sich die chemische Zusammensetzung ihrer Zellhülle deutlich von der der übrigen Bakterien unterscheidet: so fehlen mit Muraminsäure, Diaminopimelinsäure und D-Aminosäuren ein großer Teil der für das Peptidoglycan der Bakterien-ZW charakteristischen Komponenten (Brown and Shorey 1963, Kushner and Onishi 1968). Durch das Fehlen dieses für die Festigkeit und Stabilität der Bakterien-ZW außerordentlich wichtigen Makromoleküls ist die Halobakterienzelle trotz ihrer Lipoprotein-Zellhülle osmotischen Veränderungen gegenüber sehr empfindlich. Eine stufenweise Erniedrigung der Salzkonzentration (etwa 25 % Salzkonzentration in der natürlichen Umgebung) führt zu Veränderungen der Zellmorphologie. Die ursprünglich stäbchenförmigen Zellen bilden

unregelmäßige Zellformen und zuletzt sphärische Strukturen, die unterhalb einer Salzkonzentration von 10 % lysieren (Larsen 1973). Im Gegensatz dazu hat eine Konzentrations- erniedrigung des Salzmediums auf die Zellstruktur der Halokokken keinen sichtbaren Einfluß. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten (Kocur et al. 1972), daß diese Organismen im Vergleich zur dünnen Zellhülle der Halobakterien (Dicke 13-15 nm) eine mit der von grampositiven Bakterien vergleichbare ZW-Stärke von 50-60 nm Dicke aufweisen. Ähnlich der ZW der Grampositiven stellt sich auch die Halokokken-ZW im Elektronenmikroskop als homogen aufgebaute Schicht ohne erkennbare Strukturierung dar.

Die Arbeiten von Brown und Cho (1970) an isolierten Zellwänden von extrem halophilen Kokken zeigten erstmals, daß auch im ZW-Material dieser Organismen typische Bestandteile des bakteriellen Peptidoglycans, wie Muraminsäure und Diaminopimelinsäure fehlen. Reistad (1970) konnte bei der Untersuchung des Gesamtproteins von 2 extrem halophilen Kokken eine identische Aminosäurezusammensetzung von ZW-freien und ZW-haltigen Proteinfractionen feststellen; bei anderen morphologisch ähnlichen, jedoch nicht-halophilen Bakterien wie z.B. Micrococcus luteus fand Reistad (1970) dagegen erwartungsgemäß in den ZW-haltigen Präparationen signifikant höhere Werte für Lysin, Glutaminsäure, Glycin und Alanin, Aminosäuren, die im Peptidoglycan dieser Organismen vorkommen (Schleifer and Kandler 1972). Diesen Befunden entsprechend erweisen sich die Halococcus-Zellen als Penicillin- und Lysozym-resistent (Larsen 1973); bezüglich der Gramfärbung werden sie widersprüchlich als grampositiv, gramvariabel (Brown and Cho 1970) oder gramnegativ beschrieben (Bergeys Manual 1974).

Aus diesen Beobachtungen konnte gefolgert werden, daß in der ZW von Halococcus notwendig-erweise andere Bauelemente als die des Peptidoglycans für die Bildung einer starren, extrem stabilen (vgl. Lyseresistenz in Wasser) Stützstruktur verantwortlich sind. Die ersten und bisher einzigen Versuche zur

Identifizierung der ZW-Komponenten wurden von Brown and Cho (1970) unternommen. Auffälligstes Merkmal ihrer Untersuchungen war die Feststellung, daß das ZW-Material extrem halophiler Kokken zum größten Teil aus Kohlenhydratbestandteilen zusammengesetzt ist: so wurden neben Glucose, Galactose, Glucosamin und Galactosamin weitere Zuckerkomponenten isoliert, die aufgrund des chromatographischen Verhaltens als Mannose bzw. Glucuronsäure angesprochen wurden. Glycin bildete die einzige, in auffallend hohen Mengen vorhandene Aminosäure, während die übrige Aminosäurezusammensetzung den für alle Halobacteriaceen typischen (Reistad 1970) Überschuß an sauren gegenüber basischen Aminosäuren aufwies.

Allein die ninhydrinpositiven ZW-Komponenten wurden bei mehreren Halokokken-Stämmen näher untersucht (Reistad 1972, 1975). In Hydrolysaten von durch Trypsin-Verdauung gereinigten Zellwänden stellen die Amino Zucker Glucosamin und Galactosamin sowie Glucosaminuronsäure jeweils den Hauptanteil der ninhydrinpositiven Komponenten; in den meisten Fällen bildet Glycin die einzige, in signifikanten Mengen nachweisbare Aminosäure. ZW-Extraktionsversuche mit TES bzw. Formamid erbrachten keine Hinweise auf Peptidoglycan-ähnliche Polymere, die für die Erklärung der hohen Stabilität dieser Zellwände herangezogen werden hätten können.

Die Halobacteriaceen sind (zusammen mit den Mycoplasmen und bakteriellen L-Formen) die einzigen bekannten Prokaryonten, denen das gemeinsame Strukturmerkmal aller bakteriellen Zellwände, das Peptidoglycan fehlt (Schleifer and Kandler 1972). Allein die Halokokken weisen trotz der Abwesenheit dieses Murein-Sacculus eine ähnliche, wenn nicht sogar noch höhere Stabilität der Zelle im Vergleich zu den grampositiven Bakterien auf, deren ZW durch das dreidimensional quervernetztes Stützskelett des Peptidoglycans gekennzeichnet ist. Damit liefern diese extrem halophilen Kokken das unter den Prokaryonten bisher einzige Beispiel einer ZW, die - ohne eine Peptidoglycan-Struktur zu besitzen - die Festigkeit und osmotische Stabilität der Zelle gewährleistet.

Unter diesem Aspekt schien uns die genauere Untersuchung der Halococcus-ZW von großem Interesse zu sein. Neben der Analyse

aller in der ZW vorhandenen Komponenten sollte die quantitative chemische ZW-Zusammensetzung mehrerer Halokokken-Stämme erstmals einen vollständigen Überblick über die zur Bildung dieser ungewöhnlichen ZW-Struktur beitragenden Bauelemente liefern. Aufgrund der Vielfalt der von Brown and Cho (1970) identifizierten Zuckerkomponenten war unseren Vorstellungen zufolge denkbar, daß dieses ZW-Material aus mehreren Homo- oder Heteropolysacchariden zusammengesetzt ist und - ähnlich den Zellwänden von Hefen (ZW-Komplex aus Mannan, Glucan, Chitin und weiteren Polysacchariden, Heath 1971) - einen stabilen Komplex verschiedener Glycane bildet. Damit könnten sich durch die Untersuchung der ZW Hinweise auf mögliche phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen in der chemischen Zusammensetzung und Struktur der ZW von Eukaryonten und Prokaryonten ergeben. Schließlich sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, durch Aufklärung einiger struktureller Details einen Einblick in die chemische Struktur der Halococcus-ZW zu gewinnen, um damit dem Verständnis ihrer außerordentlichen Stabilität näherzukommen.

B. Material und Methoden

1. Organismen

Die Stämme Halococcus morrhuae CCM 859, CCM 889 und CCM 537 wurden von der Czechoslovak Collection of Microorganisms, J.E. Purkyne University, Brno, Tschechoslowakei erhalten.

2. Nährmedien

2.1. Flüssigkeitsmedium

Zur Anzucht der Organismen in Flüssigkeitskultur wurde das von Reistad (1970) beschriebene Medium in etwas modifizierter Form verwendet:

- (A) 230 g/l NaCl
5 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
1 g/l KCl
0.2 g/l $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
(B) 5 g/l Trypton (Oxoid)
5 g/l Hefeextrakt (Difco)

Die Lösungen A und B wurden getrennt autoklaviert (120°C, 20 min). Die Einstellung des pH war nicht erforderlich.

2.2. Agar

Die Herstellung des Salz-Milch-Agars erfolgte nach den Angaben von Sreenivasan and Venkataraman (1956):

- (A) 200 g NaCl
10 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
2 g KNO_3
2 mg Fe(III)-Citrat
gelöst in 100 ml H_2O
(B) 10 g Pepton (Merck)
25 g Glycerin
9 g Agar (Oxoid)
gelöst (nach Erhitzen im Dampftopf) in 400 ml H_2O
(C) 50 g Skim-Milk (Difco)
gelöst in 500 ml H_2O

Die Lösungen A und B wurden gemischt und das pH mit 0,1 n NaOH auf 8.4 eingestellt. Diese Agar-Salz-Mischung wurde autoklaviert,

während die Magermilch (C) für 20 min im Dampftopf erhitzt wurde. Nach Abkühlen der Lösungen auf etwa 55°C wurde C zuge-mischt (bei höheren Temperaturen erfolgt Gerinnung der Milch!) und die Platten gegossen.

3. Kulturbedingungen und Anzucht

Die als Ausstrich auf Agarplatten erhaltenen Bakterienstämme wurden regelmäßig alle 2 Monate auf frische Platten überimpft und für 3-4 Tage bei 37°C bebrütet. Um ein Austrocknen des Agars während der Bebrütungszeit und der anschließenden Lagerung bei 4°C zu verhindern, wurden die Agarplatten jeweils in luft-dicht verschlossenen Polyäthylen-Beuteln aufbewahrt.

Flüssigkeitskulturen aller Halococcus-Stämme wurden unter aeroben Bedingungen (Schüttelkultur) bei 30°C gezogen. Die Massenanzucht erfolgte in 5 l-Erlenmeyerkolben mit je 1.5 l Nährlösung. Zur Anzuchtung wurde das Medium im Verhältnis 1:10 mit einer Vor-kultur beimpft, die etwa 8 Tage inkubiert worden war. Eine optimale Zellausbeute konnte aus den Massenkulturen nach etwa 2 Wochen Bebrütungsdauer erhalten werden.

Das Wachstum der Kulturen konnte durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm im Photometer (Eppendorf) verfolgt werden.

4. Gewinnung der Zellwände (Schleifer und Kandler 1967)

Massenkulturen der Bakterienstämme wurden nach phasenkontrast-mikroskopischer Überprüfung durch Erhitzen für etwa 30 min im Dampftopf abgetötet (Inaktivierung autolytischer Enzyme) und durch Zentrifugation bei 5000 g geerntet. Das Zellsediment wurde $3 \times$ mit H_2O gewaschen, anschließend in einer Mischung mit etwa 2 Vol. Glasperlen von 0,17-0,18 mm $\emptyset$ (Firma Braun-Apparatebau, Melsungen) im Homogenisator (Firma Bühler, Tübingen) zerschlagen. Nach 20-30 min konnten in der Regel keine ganzen Zellen mehr im Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden. Mit Hilfe einer Schott-G 1-Fritte wurde das Zellhomogenisat von den Glasperlen getrennt und die "Rohzellwände" als Sediment nach vorhergehender Zentrifugation bei 40 000 g erhalten.

In der Regel wurden diese noch Protein-haltigen Zellwände durch Inkubation mit Trypsin weiter gereinigt. Dazu wurde die Roh-

zellwand in 0,05 m Phosphatpuffer pH 7.8 suspendiert und zusammen mit Trypsin (Merck, 0,5 mg/ml) nach Zugabe von 1-2 ml Toluol (zur Verhinderung von Bakterienwachstum) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die durch tryptische Verdauung gereinigten Zellwände wurden darauf bei 40 000 g abzentrifugiert, 4 x mit H₂O dest gewaschen und dann gefriergetrocknet. Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders bemerkt, mit solchen, durch Trypsin-Verdauung gereinigten Zellwänden (ZW) durchgeführt.

5. Herstellung wasserlöslicher Zellwandpräparationen

5.1. Solubilisierung der Zellwand mit Alkali

Durch Inkubation wasserunlöslichen Zellwandmaterials mit 0,5 n NaOH (5 mg ZW/ml) für 12 h bei 60°C konnte ein wasserlösliches Polymer erhalten werden, das in qualitativer wie in quantitativer Hinsicht große Ähnlichkeit mit der nativen ZW aufwies. Das solubilisierete Polymer wurde aus der alkalischen Lösung durch Fällung mit 4 Vol. Äthanol unter Tiefkühlung (-18°C) erhalten. Das entstandene Präzipitat wurde bei 5 000 g abzentrifugiert, in H₂O gelöst, nochmals mit Äthanol gefällt und abzentrifugiert. Durch Gefriertrocknung des in H₂O gelösten Sediments wurde "ZW-solubilisiert" erhalten.

5.2. Solubilisierung der Zellwand mit NaOH/NaBH₄ (Rees 1961)

Wasserunlösliche ZW wurde in einer wässrigen Lösung von NaBH₄ (2 mg/ml) für 2 Tage bei RT inkubiert (10 mg ZW/ml). Um eine Lösung von 0.5 n NaOH zu erhalten, wurde anschließend festes Na-Hydroxyd sowie weiteres NaBH₄ (200 mg/ml) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 12 h bei 60°C. Überschüssiges Borhydrid wurde durch tropfenweise Zugabe von Eisessig zerstört und die klare, rosa gefärbte Lösung für 3 Tage gegen H₂O dialysiert. Nach Gefriertrocknung konnte eine weiße, wasserlösliche Zellwandpräparation in einer Ausbeute von 80-90 % der eingesetzten Zellwandmenge erhalten werden.

6. Verfahren zur Extraktion des Zellwandmaterials

6.1. Trichloressigsäure (TES-)-Extraktion (Chatterjee, 1969)

Zellwände wurden in 5 % TES suspendiert (10 mg/ml) und 45 min

bei 60°C extrahiert. Die nach Inkubation erhaltene Suspension wurde bei 40 000 g abzentrifugiert und der klare Überstand in Eis gekühlt. Das extrahierte unlösliche Zellwandmaterial wurde zuerst mit 1 % NaHCO_3 -Lösung, dann 3 × mit H_2O gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Aus dem klaren Überstand des Extraktionsgemisches konnte nach Zugabe von 4 Vol. Äthanol bei -18°C polymeres Material ausgefällt werden. Nach Abzentrifugation (20 000 g) wurde das Sediment in H_2O gelöst, nochmals mit Äthanol gefällt, abzentrifugiert, in H_2O gelöst und dann gefriergetrocknet. Die Überstände der Äthanol-fällungen wurden einrotiert und ebenfalls aufbewahrt.

6.2. Extraktion mit Glycin/HCl-Puffer pH 3.0 (Pavlik and Rogers 1973)

Die Zellwände wurden für 20 min bei 100°C in 0.05 M Glycin/HCl-Puffer pH 3.0 inkubiert (10 mg/ml), anschließend die Suspension abzentrifugiert und aus dem klaren Überstand durch Zugabe von 4 Vol. Äthanol bei -18°C polymeres Material ausgefällt. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in einem definierten Aliquot H_2O gelöst.

6.3. Extraktion mit Alkali

Zellwandmaterial wurde jeweils 18 h bei RT mit NaOH verschiedener Konzentrationen (0,1 N, 0,25 N, 0,5 N, 1,0 N) geschüttelt (5 mg ZW/ml). Die Überstände der Inkubationsgemische wurden jeweils nach Neutralisation auf extrahiertes Material untersucht.

6.4. Extraktion von Mannan (Sentandreu and Northcote 1968)

Das zu extrahierende Material wurde in 0,5 N NaOH 1 h bei 100°C inkubiert. Anschließend wurde mit Eisessig neutralisiert und vom Ungelösten abzentrifugiert. Zum Überstand wurde Fehlingsche Lösung (Lösung A: 69,2 g Cu(II)-SO_4 in 1 l H_2O , das einige Tropfen H_2SO_4 enthält, lösen; Lösung B: 120 g NaOH und 346 g KNa-Tartrat in 1 l H_2O lösen; vor Gebrauch A und B 1:1 mischen) zugegeben. Nach 10-15 min (bei kurzem Erhitzen sofort) erfolgte bei Vorhandensein von Mannan eine Ausflockung des Polysaccharids. Nach längerem Stehen (über Nacht) wurde abzentrifugiert und das Präzipitat in 1 N HCl gelöst. Durch Zugabe von 2-3 Vol. Methanol konnte das Mannan als Präzipitat gewonnen werden.

6.5. Extraktion von pectinähnlichen Substanzen (Morikawa et al. 1974)

Zellwandmaterial wurde für 1 h bei 85°C in einer Mischung von 0,25 % Oxalsäure und 0,25 % Ammonium-Oxalat inkubiert. Nach anschließender Neutralisation wurde abzentrifugiert und zum Überstand 4 Vol. tiefgekühltes Äthanol gegeben. Da selbst nach längerer Aufbewahrung bei -18°C keine Fällung erfolgte, wurde der gesamte Überstand einrotiert, in einem definierten Aliquot H₂O gelöst und ebenso wie der unlösliche Rückstand für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

6.6. Lipid-Extraktion (Bligh and Dyer 1959)

200 mg ZW wurden in 50 ml einer Mischung von Methanol/Chloroform/H₂O = 65/30/30 (es darf keine Phasentrennung erfolgen !) für 1 h bei RT gerührt und dann über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Darauf wurden je 30 ml Chloroform und H₂O zugegeben, worauf Phasentrennung erfolgte. Die untere Chloroform-Phase wurde mit einer Pipette entfernt und einrotiert, die wässrige Zellwand-Phase abzentrifugiert, das Sediment mehrfach mit H₂O gewaschen und schließlich gefriergetrocknet.

6.7. Behandlung der Zellwand mit Fluorwasserstoff (F.Fiedler, pers.Mitteilung)

5 mg ZW wurden unter Eiskühlung mit 0,8 ml wässriger 60 % HF für 5 h in Polyäthylen-Zentrifugenbechern inkubiert. Anschließend wurde mit einer Ölpumpe über NaOH der Fluorwasserstoff abgezogen (die Verdunstungskälte sorgt für ausreichende Kühlung), der Rückstand in 0,5 ml Eiswasser suspendiert und nochmals im Ölpumpenvacuum getrocknet. Zum Rückstand wurde ein Tropfen Phenolphthalein gegeben und 1 n NaOH zugetropft, bis die Lösung neutral reagierte. Das Sediment der Extraktion wurde durch Zentrifugation gewonnen, mehrfach mit H₂O gewaschen und die Überstände jeweils gesammelt. Aus dem Extraktionsüberstand konnte durch Zugabe von 4 Vol. Äthanol unter Tiefkühlung (-18°C) polymeres Material gefällt werden, das ebenso wie der wasser-unlösliche Rückstand weiter untersucht wurde.

7. Enzymatische Behandlung des Zellwand-Polymers

7.1. Glycosidasen

Die verwendeten Exo- und Endoglycosidasen sind zusammen mit

dem gewählten Inkubationsmedium in Tabelle 1 zusammengestellt. Zur Inkubation wurde eine wasserlösliche Zellwandpräparation verwendet (4 mg ZW solubilisiert/ml). Das Inkubationsgemisch hatte folgende Zusammensetzung:

- 0,7 ml Puffer
- 0,05 ml BSA (5 mg/ml)
- 0,2 ml ZW-Lösung
- 0,05 ml bzw. 0,1 ml Enzym

Von den ursprünglich lyophilisiert vorliegenden Enzymen wurden jeweils 0,1 ml eingesetzt. Parallel zum obigen Ansatz wurden je 2 Ansätze mitgeführt, die anstatt der Zellwand- bzw. der Enzymlösung Wasser enthielten. Die Gemische wurden bei RT für 18 h inkubiert, dann zur Inaktivierung und Ausfällung der Proteine für 30 min bei 90°C behandelt und schließlich abzentrifugiert. Die Überstände der so behandelten Inkubationsgemische wurden anschließend untersucht.

Eine kombinierte Behandlung von Zellwandmaterial mit mehreren Exoglycosidasen (α -, β -Glucosidase, α -, β -Galactosidase, α -Mannosidase) wurde mit folgender Modifikation nach den obigen Bedingungen durchgeführt: Die Inkubation wurde in 3 verschiedenen Puffersystemen durchgeführt (0,1 m Citrat pH 5,0, 0,1 m Acetat pH 5,5, 0,1 m Phosphat pH 7,0); von jedem Enzym waren 20 μ l im Inkubationsgemisch vorhanden.

7.2. Proteinasen

Neben der Trypsinverdauung (s.4.) wurden Aliquots von Roh-ZW mit weiteren Proteinasen inkubiert (Merck, Broschüre).

- a) Pepsin. Rohzellwände wurden in 0,003 n Essigsäure suspendiert und 30 μ g Pepsin (Merck)/ml zugegeben.
- b) Proteinase K. Rohzellwände wurden in folgendem Puffergemisch suspendiert: 0,1 m Trispuffer pH 7,5, 6,0 m Harnstoff, 0,01 m CaCl_2 , 0,005 m NaCl. Proteinase K (Merck) wurde in einer Konzentration von 10 μ g/ml zugegeben.
- c) Pronase. Die Inkubation der Rohzellwände erfolgte in 0,07 m Phosphatpuffer pH 7,4 mit Pronase (10 μ g/ml; Calbiochem).

Zum Inkubationsgemisch wurden jeweils 1-2 ml Toluol gegeben und dann bei 37°C für 16 h inkubiert. Die Zellwände wurden anschließend 4 x mit H_2O gewaschen und gefriergetrocknet.

Tab.1: Übersicht über Art und Pufferbedingung der zur Inkubation mit ZW verwendeten Glycosidasen.

Enzym	Inkubationspuffer	Literaturangabe
α -Amylase (Boehringer)	0,01 m Phosphat pH 7.0 0,006 m NaCl	Bergmeyer (1974)
β -Amylase (Boehringer)	0,01 m Acetat pH 4.8	Bergmeyer (1974)
α -1.4- α -1.6-Amyloglucosidase (Boehringer.)	0,1 m Acetat pH 4.0	Boehringer (II)
Dextranase ^a (Koch-Light)	0,1 m K-Phosphat pH 6.0	Meth.Enzymol.Vol.VIII
α -Galactosidase (Boehringer)	0,1 m Citronensäure/ 0,2 m Na ₂ HPO ₄ pH 5.3	Meth.Enzymol.Vol.VIII
β -Galactosidase (Boehringer)	0,1 m K-Phosphat pH 7.0	Bergmeyer (1974)
α -Glucosidase (Boehringer)	0,1 m Acetat pH 6.0	Bergmeyer (1974)
β -Glucosidase (Boehringer)	0,1 m Acetat pH 5.0	Bergmeyer (1974)
N-Acetyl- β -Glucosaminidase (Boehringer)	0,1 m Citrat pH 4.5 0,1 mg BSA/ml	Boehringer (pers.Mittlg.)
β -Glucuronidase/Arylsulfatase (Boehringer)	0,1 m Acetat pH 4.5	Boehringer (I)
Glycosidasengemisch ^a (Roth)	0,1 m Acetat pH 5.0	
Hyaluronidase ^b (Boehringer)	0,3 m Na-Phosphat pH 5.3	Boehringer (II)
α -Mannosidase (Boehringer)	0,1 m Citrat pH 4.5	Boehringer (I)
Pectinase ^a (Roth)	0,1 m Citronensäure/ 0,1 m K ₂ HPO ₄ pH 5.2	Meth.Enzymol.Vol.VIII

^a Das lyophilisiert vorliegende Enzym wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml im entsprechenden Inkubationspuffer, der außerdem 0,5 mg BSA/ml enthielt, gelöst.

^b Das lyophilisiert vorliegende Enzym wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in folgendem Puffer gelöst: 0,02 m Phosphatpuffer pH 6,9, 4,5 mg NaCl/ml, 0,1 mg BSA/ml.

7.3. Weitere zur Inkubation von Zellwandmaterial verwendete Enzyme

7.3.1. DNase- und RNase-Behandlung der Zellwand

Das Zellwandmaterial wurde in 0,1 m Trispuffer pH 7,8, 0,02 m $MgCl_2$ suspendiert und mit DNase und RNase (je 50 $\mu g/ml$) (Boehringer) versetzt und nach Zugabe von 1 ml Toluol für 20 h bei RT inkubiert. Die weitere Aufarbeitung der Zellwände erfolgte wie unter 7.2.

7.3.2. Behandlung der Zellwand mit alkalischer Phosphatase

Die Zellwände wurden in 0,2 m Trispuffer pH 8,9 suspendiert und mit alkalischer Phosphatase (10 $\mu l/ml$; Boehringer) bei 37°C über Nacht inkubiert.

8. Hydrolysebedingungen

8.1. Totalhydrolysen

8.1.1. Aminosucker und Aminosäuren

Eine maximale Ausbeute an monomeren Aminosuckern (mit Ausnahme der Aminouronsäure) und Aminosäuren wurde bei Hydrolyse der Zellwände im Einschlußrohr mit 4 n HCl bei 100°C für 16 h (0,1 ml/mg) erhalten. Eine maximale Ausbeute an Aminouronsäure und eine etwa gleich hohe Ausbeute der übrigen Aminosucker im Vergleich zur obigen Methode konnte durch Hydrolyse mit 6 n HCl bei 100°C für 6 h erreicht werden.

8.1.2 Neutralzucker

Als beste Bedingung zur quantitativen Freisetzung der Neutralzucker erwies sich die Hydrolyse der ZW mit 2 n TFA für 75 min bei 120°C (0,1 ml/mg). Nach beendeter Hydrolyse wurden die Röhrchen an der Spitze aufgebrochen und die Säure mit Hilfe eines gereinigten Luftstroms unter gleichzeitiger schwacher Erwärmung der Probe im Wasserbad abgeblasen. Hydrolysate für enzymatische Bestimmungen wurden darauf in etwas H_2O gelöst und nochmals zur Trockene abgeblasen.

8.1.3. Uronsäuren

8.1.3.1. Hydrolyse zur präparativen Gewinnung der Uronsäuremonomeren (Jeffrey and Rienits 1967).

10 mg ZW wurden mit 0,1 g Dowex 50 H^+ in 1 ml 0,05 n HCl für 24 h unter gelegentlichem Schütteln bei 100°C inkubiert. Darauf wurde das Hydrolysat über eine Säule von Dowex 50 H^+ (1x3 cm) gegeben, das Eluat nochmals auf die Säule aufgetragen und anschließend die Säule mit 20 ml H_2O gewaschen. Die Elutionsflüssigkeit wurde einrotiert, in etwas H_2O gelöst und mit Ammoniak auf etwa pH 9 gebracht (Delactonisierung). Nach 2 h wurde die Lösung abgeblasen, in H_2O wieder gelöst und langsam auf eine Säule mit Dowex 1 Acetatform (1x3 cm) aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 50 ml H_2O gewaschen und das Waschwasser verworfen. Die Uronsäuren konnten nach Elution der Säule mit 30 ml 2 n Essigsäure erhalten werden.

8.1.3.2. Hydrolyse für den gaschromatographischen Nachweis der Uronsäuren (Inoue and Miyawaki 1975).

ZW-Fractionen wurden durch Inkubation mit 2 n HCl bei 100°C für 2 h hydrolysiert (De-N-Acetylierung der Aminosucker). Nach Entfernung der HCl wurde das Hydrolysat in 0,4 ml H_2O gelöst und mit gleichen Volumina an 33 % Essigsäure und 5 % $NaNO_2$ bei RT über Nacht inkubiert (Desaminierung der Aminosucker). Das Gemisch wurde anschließend über eine Dowex 50 H^+ -Säule (2x1 cm) gegeben, mit H_2O bis zu neutraler pH-Reaktion des Waschwassers gewaschen und anschließend Eluat und Waschwasser einrotiert. Die Probe wurde für mindestens 24 h über P_2O_5 getrocknet, darauf mit 1 ml methanolischer 1 n HCl (s.17.2.1) versetzt und für 20 h bei 100°C hydrolysiert. Nach der Methanolyse wurde die Probe abgeblasen und für die Gaschromatographie präpariert.

8.1.3.3. Hydrolyse der Zellwand zum papier- bzw. dünnschichtchromatographischen Nachweis der Uronsäuren

Bei Proben, die eine größere Menge an Uronsäuren enthielten, genügte zum qualitativen Nachweis eine Hydrolyse mit 2 n HCl (3 mg/ml) für 3 h bei 100°C.

8.1.4. Estergebundenes Sulfat und Gesamtacetat

Zur vollständigen Hydrolyse estergebundenen Sulfats wurde das Probenmaterial mit 4 n HCl 4 h bei 100°C hydrolysiert. Die

Sulfatgruppen der Halococcus-ZW konnten bereits unter den Hydrolysebedingungen für Neutralzucker (s.8.1.2.) quantitativ abhydrolysiert werden.

Zur Bestimmung des Gesamtacetats wurde 2 h mit 4 n HCl bei 100°C hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden anschließend sofort eiskühlt und vor dem Abblasen mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung neutralisiert.

8.1.5. Bestimmung der Hydrolysenkinetik estergebundenen Sulfats in der Zellwand (Kawai et al. 1969)

Je 0,25 ml einer stabilen ZW-Suspension (s.12.) in 0,25 n HCl (2 mg ZW/ml) wurden in Fiolax-Röhrchen eingeschmolzen und für unterschiedliche Zeiten in einem kochenden Wasserbad inkubiert. Nach beendeter Hydrolyse wurde sofort in Eis gekühlt und das Hydrolysat mit 0,25 ml 0,25 n NaOH neutralisiert. Darauf wurde zu allen Proben je 0,1 ml einer wässrigen Lösung von CTAB (30 mg/ml; Merck) gegeben und bei 37°C für 20 min inkubiert. Nach der darauffolgenden Zentrifugation wurde der Überstand auf freies Sulfat getestet.

8.2. Partialhydrolysen

8.2.1. Hydrolyse mit H_2SO_4 (Bhavanandan and Meyer 1967)

Oligosaccharide unterschiedlicher Größe, die zum Teil noch ester-gebundenes Sulfat trugen, konnten durch Inkubation von ZW mit 0,5 n H_2SO_4 (10 mg/ml) für 2,5 h bei 100°C erhalten werden. Nach der Hydrolyse wurde mit festem BaCO_3 neutralisiert, abzentrifugiert und der Überstand gegen H_2O erschöpfend dialysiert. Die niedermolekularen dialysierbaren Oligosaccharide wurden nach Einrotieren der Dialyseflüssigkeit weitergereinigt.

8.2.2. Hydrolyse mit Oxalsäure (Abdel-Fattah et al. 1974)

Die Partialhydrolysate wiesen eine im Vergleich zur H_2SO_4 -Hydrolyse etwas höhere Ausbeute an sulfatisierten Oligosacchariden auf. Die Hydrolyse der Zellwände erfolgte in 0,5 n Oxalsäure bei 100°C für 4 bzw. 5 h. Das Hydrolysat wurde anschließend mit festem CaCO_3 neutralisiert, abzentrifugiert, der Überstand erschöpfend gegen H_2O dialysiert, die Dialyseflüssigkeit auf wenige ml eingeengt und mit etwas HCl angesäuert. Anorganisches Sulfat

wurde durch Zugabe von einigen Tropfen einer BaCl-Lösung ausgefällt; darauf wurde mit festem AgCO_3 neutralisiert (Entfernung der Cl^- -Ionen) und wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann weiter eingeengt, wobei jeweils von ausgefallenem Material wieder abzentrifugiert wurde.

8.2.3. Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA)

Eine gute Ausbeute an 2 ninhydrin-positiven Oligosacchariden konnte durch Hydrolyse der ZW mit 6,5 n TFA (10 mg/ml) bei 100°C (kochendes Wasserbad) für 2 h erhalten werden. Nach der Inkubation wurde das Hydrolysat zur Entfernung der Säure mehrmals mit H_2O einrotiert, dann mit NH_3 neutralisiert und abgeblasen. Zur Entfernung von Huminstoffen, die eine irreversible Adsorption von Oligosacchariden an Dowex hervorrufen können (Romanovska and Reihold 1973) wurde zum gelösten Rückstand eine kleine Spatelspitze Aktivkohle gegeben. Nach Zentrifugation wurde der farblose Überstand mit Dowex 50 H^+ weiter fraktioniert.

8.2.4. Partialhydrolyse zur Gewinnung Uronsäure-haltiger Oligosaccharide (Shively and Conrad 1970)

20 mg ZW wurden mit 1 n H_2SO_4 für 24 h bei 100°C hydrolysiert (10 mg ZW/ml). Nach Neutralisation mit festem BaCO_3 wurde der Überstand der darauffolgenden Zentrifugation abgeblasen und in 0,1 m Trispuffer pH 8,6 aufgenommen. Die Probe wurde anschließend mit Dowex 1 Acetatform (1 g) für 2 h gerührt, abzentrifugiert und zum Überstand nochmals dieselbe Menge an Dowex 1 gegeben. Die Elution der Uronsäure-haltigen ZW-Fragmente vom Ionenaustauscherharz erfolgte mit 2 n TFA. Nach mehrfachem Einrotieren des Eluates wurde die neutrale Probe in H_2O aufgenommen.

8.2.5. Hydrolyse zum Nachweis von Oligopeptiden

Zum papierchromatographischen Nachweis von Oligopeptiden wurde die ZW mit 4 n HCl (0,1 ml/mg) für 1 h bei 100°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde darauf mehrfach abgeblasen und in einem Aliquot H_2O wieder gelöst.

9. Papier- und Dünnschichtchromatographie bzw. Elektrophorese

9.1. Laufmittelgemische, Puffergemische

- Gemisch A: Isopropanol/Eisessig/H₂O = 75/15/10 (v/v)
" B: α -Picolin/Ammoniak/H₂O = 70/2/28 (v/v)
" C: 88 % Phenol/Eisessig/1 m EDTA/H₂O = 840/10/1/160 (v/v)
" D: Butanol/Pyridin/Eisessig/H₂O = 60/40/3/30 (v/v)
" E: Äthylacetat/Butanol/Eisessig/H₂O = 210/280/175/280 (v/v)
" F: Pyridin/Äthylacetat/Eisessig/H₂O = 5/5/1/3 (v/v)
Zur Sättigung der Atmosphäre wurde ein Gemisch von Pyridin/Äthylacetat/H₂O = 11/40/6 verwendet (Fischer und Nebel 1955).
" G: Chloroform/Methanol/Eisessig/H₂O = 65/25/3/8 (v/v)
Puffer I: Eisessig/Ameisensäure/H₂O = 75/20.5/90.5 (v/v/v) pH 1.8
" II: Pyridin/Eisessig/Ameisensäure/H₂O = 1/10/1.5/90 (v/v/v/v) pH 2.8 (Mayer 1969)
" III: Pyridin/Eisessig/H₂O = 10/4/86 (v/v/v) pH 5.3
" IV: 1.5 m K-Phosphatpuffer pH 6,0

9.2. Durchführung

Die papierchromatographische und papierelektrophoretische Trennung von Mono- und Oligosacchariden erfolgte auf Chromatographiepapier Whatman 1 (analytisch), Whatman 3 MM (präparativ) und Schleicher und Schüll 2043b (analytisch und präparativ). Für die Dünnschichtchromatographie bzw. Elektrophorese wurden Cellulose-Fertigplatten (Merck) verwendet.

Die Identifizierung der Zucker erfolgte anhand von Referenzchromatogrammen bzw. durch Cochromatographie (Coelektrophorese).

9.2.1. Chromatographie

Die Auftrennung von Aminosuckern, Aminosäuren und Peptiden erfolgte in den Systemen A und B (in jeder Richtung 2 x 24 h). System A eignete sich auch zur dünnenschichtchromatographischen Identifizierung der Aminosucker.

Neutralzucker wurden zweidimensional absteigend in den Gemischen C (24 h) und D (18 h) aufgetrennt.

Die Uronsäuren konnten auf zweidimensionalen Chromatogrammen in den Systemen D und E getrennt werden.

Als das am vielseitigsten verwendbare Chromatographiesystem zur Trennung von Mono- und Oligosacchariden bewährte sich Gemisch F, das sogenannte Fischer-Nebel-System (Abb.1). Je nach Bedarf wurde in diesem Laufmittel zwischen 10 h und 72 h chromatographiert.

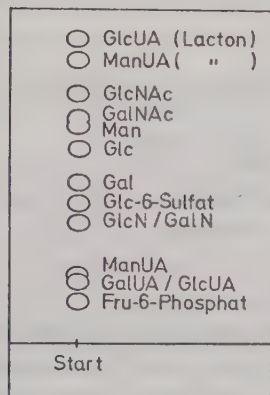


Abbildung 1 :
Trennung verschiedener Mono-
saccharide in Gemisch F
(Laufzeit des Chromatogramms
24 h)

Zur dünnsschichtchromatographischen Trennung von Glucuronsäure und Mannuronsäure (Lactone) wurde System F benutzt. Dinitrophenylierte Aminos Zucker konnten nach Dünnschichtchromatographie in Puffer IV, DNP-Aminosäuren (auf Kieselgel) in Gemisch G als Laufmittel nachgewiesen werden.

9.2.2. Elektrophorese

Die papierelektrophoretische Trennung sulfatisierter Oligosaccharide wurde im Puffersystem I durchgeführt. Pherogramme für präparative Zwecke wurden nach sorgfältigem Trocknen mit H_2O eluiert; die zum Auffangen der Eluate bestimmten Röhrchen enthielten zur Neutralisation jeweils 0,5 ml einer 1 m NH_3 -Lösung. Die präparative Trennung von Uronsäuremonomeren erfolgte in Puffer II.

Die Papierelektrophoresen wurden jeweils bei Feldstärken von 60 V/cm und einer Elektrophoresedauer von 1-3 h durchgeführt.

Für die dünnschichtelektrophoretische Differenzierung zwischen Glucuronsäure und Galacturonsäure wurde das Puffergemisch III benutzt. Da die elektrophoretische Trennung nur zwischen der Säureform der beiden Uronsäuren möglich ist, mußten die Hydrolysate vorher delactonisiert (s.19.) werden. Die Dauer der Elektrophorese betrug bei Feldstärken von 25 V/cm etwa 3-4 h.

9.3. Anfärbetechniken zum papier- bzw. dünnschichtchromatographischen Nachweis

9.3.1. Aminozyucker, Aminosäuren und Peptide

Als Nachweisreagens diente ein Ninhydrin-Sprühmittel in folgender Zusammensetzung: 930 ml wassergesättigtes Butanol

70 ml Eisessig

5 g Ninhydrin (Merck)

Die Chromatogramme bzw. Pherogramme wurden im Thermostaten bei 100°C entwickelt.

9.3.2. Neutralzucker und Uronsäuren

9.3.2.1. Anfärbung mit Silbernitrat/Alkali (Trevelyan et al.1950)

Folgende Lösungen wurden benötigt:

A. 5 ml gesättigte AgNO_3 -Lösung auf 1000 ml Aceton. Es wurde soviel H_2O zugegeben, bis der AgNO_3 -Niederschlag vollständig gelöst war.

B. 10 ml gesättigte NaOH-Lösung gelöst in 400 ml Äthanol.

C. 10 % Na-Thiosulfat-Lösung.

Die Chromatogramme wurden durch die Lösung A gezogen bzw. besprüht und getrocknet. Anschließend wurde mit B gesprüht, wobei sich reduzierende Zucker sofort als dunkelbraune Flecken zeigten. Durch Bedampfen der Chromatogramme über einem Wasserbad wurden auch nichtreduzierende Zucker sichtbar. In Lösung C wurden die entwickelten Chromatogramme darauf fixiert, anschließend gewässert und getrocknet.

9.3.2.2. Anfärbung mit Anilinphtalat (Partridge 1949)

Die Chromatogramme wurden mit folgendem Reagens besprüht:

0,91 ml Anilin

1.66 g Phthalsäure

100 ml wassergesättigtes Butanol

Anschließend wurde 5 min bei 100°C entwickelt. Aldo-Pentosen zeigten sich dabei als hellrote Flecken, Aldo-Hexosen als grün bis braun gefärbt und die Uronsäuren als braune Flecken. Geringe Mengen konnten nach dieser Anfärbung noch durch ihre intensive Fluoreszenz im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

9.3.2.3. Nachweis für Uronsäurelactone und Ester (Clotten and Clotten 1962)

Folgende Lösungen wurden benötigt:

A. 7 g Hydroxylamin-Hydrochlorid in 100 ml Methanol lösen und mit 100 ml einer Lösung von 7.2 % KOH in Methanol mischen. Vom ausgefallenen KCl abfiltrieren.

B. 1 g Fe(III)-Chlorid in 100 ml 1 % HCl lösen.

Die Chromatogramme wurden nach Besprühen mit A 15 min an der Luft getrocknet. Dann wurde mit B übersprüht. Uronsäurelactone erschienen dabei oliv bis rot, Galacturonsäure zeigte sich als goldgelb gefärbter Fleck, Glucuronsäure war rotviolett gefärbt.

10. Säulenchromatographie

10.1. Gelfiltration

10.1.1. Entsalzung mit Sephadex G-15.

Zur Entsalzung niedermolekularer Fraktionen wurden folgende Bedingungen gewählt:

Säule:	Sephadex G-15 (2.5 × 70 cm)
	Ausschlußvolumen der Säule: 145 ml
Elutionspuffer:	0,02 M Triäthylamin-/Carbonatpuffer pH 7.8
Elutionsgeschwindigkeit	0.5 - 1.0 ml/min
Fraktionsvolumen:	5 ml

Auf die Säule wurden jeweils 5-10 ml der Probelösung aufgetragen. Die Elution organischen Materials wurde durch Messung der Extinktion bei 206 nm bzw. mit Hilfe der Phenol/H₂SO₄-Methode (s.12.4) gemessen. Durch Messung der Leitfähigkeit der einzelnen Fraktionen (Gerät LF 39, Firma WTW Weilheim) wurde die Eluierung des Salzes registriert. Die salzfreien, zuckerhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt.

10.1.2. Gelfiltration mit Biogel P-2 (Trennung bis Molekulargewicht 1800)

Säule: Biogel P-2 (1,5 × 110 cm)
Ausschlußvolumen : 90 ml
Elutionsmittel : 0,01 n Essigsäure
Elutionsgeschwindigkeit: 0,2 ml/min
Fraktionsvolumen: 2,8 ml

10.1.3. Gelfiltration mit Sephadex G-100 (Trennung im Bereich von Molekulargewicht 1000-100 000)

Säule: Sephadex G-100 (2 × 100 cm)
Ausschlußvolumen: 66 ml
Elutionsmittel: H₂O
Elutionsgeschwindigkeit: 0,1 ml/min
Fraktionsvolumen: 5 ml

10.1.4. Gelfiltration mit Sephadex G-200 (Trennung im Bereich von Molekulargewicht 1000 - 200 000)

Säule: Sephadex G-200 (2,2 × 80 cm)
Ausschlußvolumen: 110 ml
Elutionspuffer: 0,03 M Tris-/HCl-Puffer pH 7,6
Elutionsgeschwindigkeit: 0,1 ml/min
Fraktionsvolumen: 2,7 ml

10.2. Ionenaustausch-Chromatographie

10.2.1. Ecteola-Cellulose

Die Fraktionierung gelöster ZW (10 mg) wurde mit Hilfe des Anionenaustauschers Ecteola-Cellulose (Serva) Cl⁻-Form versucht. Die Säule (0,8 × 2 cm) wurde nach Auftragen der Probe mit 20 ml H₂O gewaschen und dann stufenweise (je 20 ml von : 0,5 M, 1,0 M, 2,0 M, 3,0 M NaCl) eluiert.

10.2.2. DEAE-Cellulose

Säule: DEAE-Cellulose (Serva) (1,5 × 15 cm)
Elution: Stufengradient mit je 60 ml Triäthylamin-/Carbonatpuffer pH 7,8 der Molaritäten: 0,02 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,7 M, 1,0 M.

Die gesammelten Fraktionen wurden 3 x mit H_2O einrotiert und dann in je 1 ml H_2O Gelöst.

10.2.3. DEAE-Sephadex

Säule: DEAE-Sephadex (A 50) (1.5 x 15 cm)

Elution: Linearer Gradient mit folgenden Lösungen:

Mischgefäß : 100 ml 0,02 m Triäthylamin-/Carbonatpuffer

Reservoir: 100 ml 1.0 m Triäthylamin-/Carbonatpuffer pH 7.8

Anschließend wurde weitereluiert mit 100 ml 1,0 m

$(NH_4)HCO_3$ -Lösung. Fraktionsvolumen: 3 ml.

10.2.4. Amberlite IRA-400

Die nach Dialyse eines ZW-Partialhydrolysats erhaltene niedermolekulare Fraktion wurde auf eine Anionenaustauscher-Säule (1 x 13 cm) von Amberlite IRA-400 Acetatform aufgetragen. Die Neutralfraktion wurde erhalten durch Waschen der Säule mit H_2O , bis im Eluat kein Kohlenhydrat mehr nachweisbar war. Die Elution der sauren Oligosaccharide erfolgte mit 1 n TFA bis zur negativen Reaktion des Eluates auf Kohlenhydrate. Beide Fraktionen wurden anschließend am Rotationsverdampfer mehrfach eingeengt und schließlich in einem Aliquot H_2O gelöst.

11. Gaschromatographische Methoden

Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden an einem Hewlett-Packard Research Chromatograph Model 7620 A durchgeführt. Die Temperatur des Einspritzblocks und des Detektors (Flammenionisationsdetektor) betrug 250°C. Als Trägergas diente Stickstoff (Durchflußrate 25-30 ml/min), als Brenngase nachgereinigter Wasserstoff (Rate 30-40 ml/min) und nachgereinigte Preßluft (Rate 300-400 ml/min).

11.1. Gaschromatographie von Alditolacetaten (Albersheim et al.1967)

11.1.1. Neutralzucker und Polyole

Die Hydrolysate wurden in 1 ml 0,5 n NH_3 -Lösung gelöst und nach Zugabe von 10 mg $NaBH_4$ für 2 h bei RT reduziert. Überschüssiges $NaBH_4$ wurde anschließend durch tropfenweise Zugabe von Eisessig

zerstört. Zur Entfernung des dabei gebildeten Borats (Komplexbildung mit Zuckern) wurde das Gemisch bei etwa 40°C abgeblasen, in 1 ml Methanol gelöst und wieder abgeblasen. Diese Behandlung mit Methanol erfolgte 4 x. Zum trockenen Rückstand wurde darauf 1 ml Essigsäureanhydrid gegeben, das Röhrchen zugeschmolzen und für 4 h bei 120°C inkubiert. Nach Abzentrifugation unlöslichen Materials konnten die peracetylierten Proben in den Gaschromatographen eingespritzt werden. In der Regel erfolgte jedoch eine Konzentrierung der Probe durch Extraktion mit Chloroform (Shaw and Moss 1969); dazu wurde zu der peracetylierten Probe unter Eiskühlung 1,5 ml Pyridin und einige Tropfen H₂O zugegeben, so daß eine klare Lösung entstand. Bei RT wurde nun abgeblasen und der Rückstand so oft in H₂O aufgenommen und wieder abgeblasen, bis kein Essigsäure- und Pyridingeruch mehr feststellbar war. Schließlich wurde die Probe in 0,5 - 1 ml H₂O aufgenommen und 2 x mit demselben Volumen an Chloroform extrahiert. Die untere Chloroformphase wurde jeweils mit Hilfe einer Pasteur-Pipette entnommen und die gesammelten, die Alditolacetate enthaltenden Extrakte nochmals abgeblasen. Vor dem Einspritzen in den Gaschromatographen wurde die Probe in einem Aliquot Chloroform gelöst. Es wurden in der Regel 3-5 µl der Probe mit Hilfe einer Hamilton-Mikroliterspritze aufgetragen. Die Trennung der Zuckerderivate erfolgte in einer Stahl-Säule (1,5 m x 1/8"), die folgende Füllung aufwies: 0,2 % Diäthylenglycoladipatpolyester, 0,2 % Diäthylenglycolsuccinatpolyester und 0,4 % Silicon GE XF 1150 auf Gaschrom P (100 - 200 mesh) (alle Produkte von Serva). Als Temperaturprogramm wurde gewählt für Neutralzucker: 120°C 4 min isotherm, dann 4°C/min bis 180°C; 4 min isotherm 180°C.

Polyole: 100°C 4 min isotherm, dann 4°C/min bis 180°C.

11.1.2. Nachweis der Uronsäuren als Alditolacetate (Jones and Albersheim 1972)

Da die Uronsäuren nach Reduktion der Carboxylgruppe als die entsprechenden Neutralzucker nachgewiesen werden, ist die vorhergehende Trennung eines Hydrolysats in eine Neutralzucker- und eine Uronsäurefraktion notwendig.

Die Zellwandhydrolysate (s.8.1.3.3.) wurden mit NaBH_4 reduziert und anschließend mit Methanol 4 x abgeblasen (s.11.1.1.). Die durch Reduktion aus den Uronsäuren entstandenen Aldonsäuren wurden von den aus Neutralzuckern entstandenen Alditolen mit Hilfe von Dowex 1 Acetat-Form abgetrennt. Zu 3 ml der Lösung wurden 0,3 g des Harzes gegeben und für 1 h bei RT gerührt. Darauf wurde abzentrifugiert, der Überstand mit weiteren 0,2 g des Harzes für 1 h gerührt und wieder abzentrifugiert. Jedes der beiden Dowex-Sedimente wurde 2 x mit je 5 ml H_2O gewaschen; das Waschwasser sowie der Überstand der letzten Zentrifugation enthielten die neutralen Alditole. Die Aldonsäuren wurden vom Ionenaustauscher eluiert, indem jedes der beiden Harze in 2 ml 1 n HCl für 30 min bei RT gerührt wurde. Nach Abzentrifugation wurden die Sedimente mit je 2 ml H_2O gewaschen, Waschwasser und Eluate vereinigt. Durch Abblasen der stark sauren Lösung bei 40°C wurden die Aldonsäuren in ihre Lactone überführt. Die getrockneten Proben wurden darauf in einigen Tropfen 0,01 m Boratpuffer pH 7.5 gelöst und mit je 10 mg NaBH_4 in 0,5 ml desselben Puffers für 2 h reduziert. Die weitere Aufarbeitung der zu Neutralzuckern reduzierten Aldonsäuren erfolgte wie in 11.1.1.

11.2. Gaschromatographie von Butylboronaten (Eisenberg 1974)

Der gaschromatographische Nachweis von Uronsäuren als Butylborsäure-Derivate erwies sich als vorteilhaft, da hier Neutralzucker und Uronsäuren nebeneinander nachgewiesen werden können. Die Hydrolysate (s.8.1.3.2.) wurden delactonisiert (s.19.) und anschließend in 0,5 ml 0,5 n NH_3 -Lösung mit 5 mg NaBH_4 für 1 h reduziert. Nach Zerstörung des überschüssigen NaBH_4 mit Eisessig wurde 4 x mit Methanol abgeblasen und der trockene Rückstand in 0,5 ml HCl konz. gelöst (Lactonisierung der Aldonsäuren). Die Säure wurde bei RT abgeblasen, restliche Spuren durch Erhitzen der Probe (5 min bei 100°C) im Vakuum entfernt. Zum getrockneten Rückstand wurde 1 ml 5 % n-Butylborsäure (Serva) in wasserfreiem Pyridin (Siedepunkt 113-115°C) gegeben und 10 min bei 100°C erhitzt. Nach Abzentrifugation vom Ungelösten konnte die Probe in den Gaschromatographen eingespritzt werden. In der Regel wurde die Probe jedoch noch konzentriert: nach Abblasen

wurde der Rückstand 2 x mit je 0,5 ml Toluol extrahiert, die vereinigten Extrakte wiederum abgeblasen und in einem Aliquot Toluol wieder gelöst. Die Trennung der Butylborsäure-Derivate erfolgte in einer Stahlsäule (3 m x 1/8") mit 3 % OV 17 auf Gaschrom Q (80-100 mesh). Temperaturprogramm: 180°C 2 min isotherm, dann 2°C/min bis 200°C.

12. Quantitative Bestimmungsmethoden

Zur quantitativen Bestimmung wurden Lösungen der Proben in definierter Konzentration benutzt. Soweit es sich um wasser-unlösliches Material handelte (ZW), wurden stabile Suspensionen der Probe hergestellt; dazu wurde eine definierte Menge des Zellwandmaterials eingewogen, ein Aliquot H₂O zugegeben und durch Ultraschallbehandlung (MSE 100 W Ultrasonic disintegrator) für 1 min eine Suspension mit bekannter Konzentration hergestellt.

12.1. Aminosucker, Aminouronsäuren und Aminosäuren

12.1.1. Aminosäureanalysator

Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines Aminosäure-analysators (Beckman Model 120C). Elutionsbedingungen der Säule: Zuerst Puffer A (0,2 m Na-Citratpuffer pH 3,24), nach 100 min Puffer B (0,7 m Na-Citratpuffer pH 4,20). Temperaturwechsel von 30°C auf 55°C nach 15 min.

Zur Feststellung der molaren Absorptionskoeffizienten (Konstanten) der Aminosucker wurde ein Standardgemisch von GlcNac und GalNac (zusammen mit einem Gemisch aller übrigen ZW-Komponenten in ungefährender quantitativer Relation zur ZW-Zusammensetzung) den Aminosucker-Hydrolysebedingungen (s.8.1.1.) unterworfen.

12.1.2. Elson-Morgan-Test

Die quantitative Bestimmung des Gesamt-Aminosuckergehalts erfolgte durch eine Modifikation des Elson-Morgan-Tests (Boas 1953) nach Johnson (1971).

Lösungen: A. 4 % Acetylaceton in 1,5 m Na₂CO₃

B. 2,67 % (w/v) p-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Lösung von 95 % Äthanol/HCl konz. = 1/1

Standard: 100 µg Glucosamin/ml.

Durchführung: Die Proben (2-40 µg Aminosucker) wurden in 1 ml H₂O gelöst. 1 ml der frisch hergestellten Lösung A wurde zugegeben und das Gemisch 30 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde auf RT abgekühlt und nach 10 min 5 ml 96 % Äthanol zugegeben. Nach Mischen und Zugabe von 1 ml Lösung B wurde wiederum gemischt und nach etwa 30 min die Extinktion der Proben bei 530 nm bestimmt.

Auswertung: Die in der Regel aus 5-7 Meßpunkten bestehende Eichgerade wurde rechnerisch ausgewertet (Galambos 1967):

$$\text{Steigung } b \text{ der Eichgeraden} = \frac{\sum x y}{\sum x^2};$$

x = Menge [µg] des Standards

y = die zur entsprechenden Standardprobe
gemessene Extinktion.

Die unbekannte Menge in einer Probe x' läßt sich demnach aus gemessener Extinktion der Probe y' und der Steigung b der Eichgeraden errechnen:

$$x' [\mu g] = \frac{y'}{b};$$

12.1.3. Morgan-Elson-Test

Zur quantitativen Bestimmung der gesamten N-acetylierten Aminosucker wurde die von Reissig et al. (1955) beschriebene Methode verwendet.

Lösungen: A. 0.1 m Boratpuffer pH 9,2

B. 10.5 g Dimethylaminobenzaldehyd gelöst in 87,5 ml Eisessig und 12.5 ml HCl konz.; vor Gebrauch 1/10 mit Eisessig verdünnen.

Standard: 0.2 µMol N-Acetylglucosamin/ml

Durchführung: Die Proben (0.01-0.1 µMol N-Acetyl-Aminosucker) wurden in 0,5 ml H₂O gelöst. Nach Zugabe von je 0.1 ml Lösung A wurde 3 min bei 100°C erhitzt, dann schnell abgekühlt. Darauf wurde den Proben 3 ml Lösung B zugesetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Messung der Extinktionen bei 578 nm wurde wie in 12.1.2. ausgewertet.

11.1.4. Bestimmung des Aminosuckergehaltes nach Dische und Borenfreund (1950) (Anhydrohexose-Test)

Der Vorzug dieser Methode besteht darin, daß Aminosucker quantitativ im Polymer bestimmt werden können (ohne vorhergehen):

Hydrolyse). Voraussetzung ist jedoch, daß die Aminogruppen der Aminosucker unsubstituiert vorliegen.

Lösungen: A. 5 % NaNO_2 -Lösung

B. 33 % Essigsäure

C. 12,5 % Ammonium-Amidosulfonat (Ammoniumsulfamat, Merck)

D. 5 % HCl

E. 1 % Indol in Äthanol

Standard: 100 μg Glucosamin/ml

Durchführung: Von jeder Probe (5-100 μg Aminosucker in 0,5 ml) wurden 2 Parallelröhrchen angesetzt. Zu jeweils einem der Proberröhrchen (Probe 1) wurden nacheinander je 0,5 ml der Lösungen A und B pipettiert, geschüttelt und für 10 min bei RT stehen gelassen (Desaminierung der Aminosucker).

Überschüssige salpetrige Säure wurde durch Zugabe von 0,5 ml der Lösung C unter häufigem Schütteln der Röhrchen (ca. 30 min lang) entfernt. Zu den entsprechenden Parallelproben (Probe 2) wurden je 1,5 ml einer Mischung pipettiert, die zu gleichen Teilen aus den Lösungen A, B, C bestand. Nachdem alle Proben mit je 2 ml Lösung D und 0,2 ml der Lösung E vermischt worden waren, wurde 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Zur Entfernung der bei Abkühlung auftretenden leichten Trübung wurden je 2 ml Äthanol zugegeben und die Röhrchen kräftig geschüttelt. Die Extinktion der Proben mußte bei 492 nm und 520 nm bestimmt werden.

Auswertung: Die zur Berechnung des Aminosuckergehaltes nach 12.1.2 erforderliche Extinktion ΔE wurde ermittelt aus:

$$\Delta E = (\text{Extinktion}_{492 \text{ nm}}^{\text{Probe 1}} - E_{520 \text{ nm}}^{\text{Probe 1}}) - (E_{492 \text{ nm}}^{\text{Probe 2}} - E_{520 \text{ nm}}^{\text{Probe 2}});$$

Anmerkung: Durch Verlängerung der Desaminierungsdauer von 10 min auf 80 min können mit Hilfe dieser Bestimmungsmethode auch Aminosucker, deren Aminogruppe durch Sulfat substituiert ist (2-Desoxy-2-Sulfamido-hexosen) quantitativ bestimmt werden (Lagunoff and Warren 1962).

12.1.5 Quantitative Bestimmung der freien Aminogruppen (Ghuysen and Strominger 1963)

Zur Bestimmung freier unsubstituierter Aminogruppen (in Hydrolysaten oder polymerem Material) wurde eine etwas modifizierte Methode benutzt.

Lösungen: A. 1 % $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ in H_2O

B. 130 μl Fluorodinitrobenzol (Merck) in 10 ml Äthanol

Standard: 1 mg Glucosamin/ml

Durchführung: 0,1 ml der Probe (5-40 μg Glucosamin-Äquivalente) wurden mit 0,4 ml der Lösung A und 0,5 ml der Lösung B versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden 1 ml Äthanol und 2 ml 2 n HCl zugegeben und die Extinktion der Proben bei 420 nm bestimmt. Die Auswertung mit Hilfe der Eichgeraden erfolgte wie in 12.1.2.

12.2. Neutralzucker

Glucose, Mannose und Galactose wurden enzymatisch in einer für den Halbmikromaßstab modifizierten Methode nach Bergmeyer (1974) bestimmt.

12.2.1. Glucose- und Mannosebestimmung

Reagentien: Puffer: 0,05 m Triäthanolamin-Hydrochlorid

(0,93 g/100 ml)

0,007 m $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (0,142 g/100 ml)

0,0014 m Mercaptoäthanol (10 μl /100 ml)

pH 7.6 mit 1 n KOH eingestellt

ATP, NADP je 10 mg/ml

Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

(HK/G-6P-DH) (1 mg/ml; Boehringer)

Phosphoglucose-Isomerase (PGI) (2 mg/ml; Boehringer)

Phosphomannose-Isomerase (PMI) (2 mg/ml; Boehringer)

Testansatz: 1,00 ml Puffer

0,05 ml ATP

0,05 ml NADP

0,20 ml Probe

Extinktion E_1 bei 366 nm bestimmen

0,01 ml HK/G-6P-DH

nach 5-10 min E_2 ablesen

0,01 ml PGI

0,01 ml PMI

wenn keine Extinktionsänderung mehr erfolgt

E_3 ablesen

Auswertung: Die dem Glucosegehalt entsprechende Extinktionszunahme ergibt sich aus $E_2 - E_1$. Der Mannose-Gehalt läßt sich aus $E_3 - E_2$ ermitteln.

12.2.2. Galactose-Bestimmung

Reagentien: Puffer: 0,1 m Tris-/HCl-Puffer pH 8.6

0,01 m EDTA

0,0014 m Mercaptoäthanol (10 μ l/100 ml)

NAD 12,5 mg/ml

Galactose-Dehydrogenase (Gal-DH) (1 mg/ml; Boehringer)

Testansatz: 1,00 ml Puffer

0,05 ml NAD

0,20 ml Probe

E_1 bei 366 nm ablesen

0,01 ml Gal-DH

wenn keine Extinktionszunahme mehr erfolgt

E_2 ablesen.

Die Auswertung erfolgte entsprechend 12.2.1.

12.2.3. Bestimmung von Galactose und Glucose nebeneinander

Um Probenmaterial zu sparen, wurde bei Analysen, in denen der Mannosegehalt nicht bestimmt werden mußte, Galactose und Glucose durch eine Modifikation der obigen Tests nebeneinander bestimmt.

Reagentien: wie in 12.2.2.

ATP, NADP, HK/G-6P-DH wie in 12.2.1.

dazu: 0,2 m $MgCl_2 \times 6 H_2O$ -Lösung.

Testansatz und Durchführung: Zuerst Galactosebestimmung wie in 12.2.2. Darauf wurde dem Gemisch zugegeben:

0,10 ml $MgCl_2$ -Lösung

0,05 ml ATP

0,05 ml NADP

E_3 ablesen

0,01 ml HK/G-6P-DH

E_4 nach Ablauf der Reaktion ablesen.

Die Auswertung ergibt sich entsprechend 12.2.1. und 12.2.2.

Anmerkung: Vergleichende Analysen zeigten, daß auch eine quantitative Bestimmung aller 3 Zucker nebeneinander möglich ist; die Galactose-Werte liegen jedoch etwa 10-20 % niedriger als in der unabhängigen Galactose-Bestimmung.

Glucose und Mannose wurden in diesem Fall wie in 12.1.2. bestimmt. Anschließend wurde zu dem Reaktionsgemisch 0,05 ml NAD pipettiert, E_4 bestimmt und nach Zugabe von Gal-DH (10 μ l) E_5 gemessen.

12.3. Gesamtgehalt an Uronsäuren

12.3.1. m-Phenylphenol-Methode (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973)

Lösungen: A. 0,0125 m Na-Tetraborat in H_2SO_4 konz.

B. 0,15 % m-Phenylphenol (Eastman-Kodak) in 0,5 % NaOH.

Standard: 100 μ g Glucuronsäure (freie Säure)/ml

Durchführung: 0,2 ml der unhydrolysierten Probe (0,5 - 15 μ g Uronsäure) wurden mit 1,2 ml der Lösung A gemischt, in Eis gekühlt und anschließend 5 min im Wasserbad bei 100°C erhitzt. Nach Abkühlung in Eiswasser wurden 0,02 ml der Lösung B zugegeben und gut vermischt. 10 min später wurde die Extinktion der Proben bei 520 nm bestimmt.

Bei Proben, die viel Neutralzucker enthalten, tritt oft nach dem Erhitzen eine unspezifische bräunliche Färbung auf. Zur Korrektur der gemessenen Extinktionen wurde daher in solchen Fällen eine Parallelprobe mitgeführt, der anstatt der Lösung B 20 μ l einer 0,5 % NaOH-Lösung zugegeben wurden. Die Auswertung anhand der Eichgeraden erfolgte wie in 12.1.2.

12.3.2. Carbazol-Methode (Galambos 1967)

In einigen Fällen wurde die Farbentwicklung der obigen Bestimmungsmethode durch in der Probe vorhandene (unbekannte) Substanzen gestört. Der Uronsäuregehalt wurde deshalb nach der folgenden Methode bestimmt.

Lösungen: A. 4 m Ammonium-Amidosulfonat (Merck)

B. 1 m Boratpuffer pH 8.4 (Borsäure/KOH)

C. 0,2 % Carbazol in Äthanol

Standard: 100 μ g Glucuronsäure bzw. Galacturonsäure/ml

Durchführung: 0,8 ml der unhydrolysierten Probe (5-50 µg Uronsäure) wurden mit je 0,1 ml der Lösungen A und B gemischt. Dann erfolgte die Zugabe von 5,0 ml H_2SO_4 konz. Die Proben wurden anschließend 6,5 min im Wasserbad bei 100°C erhitzt, in Eiswasser abgekühlt und mit 0,2 ml der Lösung C vermischt. Nach weiterem Erhitzen für 10 min bei 100°C konnte die Extinktion der auf RT abgekühlten Proben bei 525 nm gemessen werden.

Anmerkung: Während in der m-Phenylphenol-Methode Glucuronsäure und Galacturonsäure dieselben molaren Extinktionen aufweisen, (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973) zeigte die Carbazolmethode für Glucuronsäure (γ -Lacton) eine etwa 1,5-fach höhere molare Extinktion als die Galacturonsäure.

12.4. Bestimmung der Gesamtzucker mit der Phenol-Methode (Herbert et al. 1971)

Diese Methode eignete sich als schnelles quantitatives Bestimmungsverfahren zum Testen von Säuleneluat.

Reagens: 5 % (w/v) Phenol in H_2O

Standard: 200 µg Glucose/ml

Durchführung: In dickwandige Reagensgläser von 16-20 mmØ wurde 1,0 ml der unhydrolysierten Probe (20-100 µg Glucose-äquivalente) pipettiert und 1,0 ml des Reagens zugemischt. 5,0 ml H_2SO_4 konz. wurden schnell in direktem Strahl auf die Oberfläche des Reaktionsgemisches pipettiert und sofort kräftig gemischt. Nach 10 min Stehen bei RT wurden die Proben nochmals gut gemischt und in einem Wasserbad bei 25-30°C für 10-20 min inkubiert. Im Anschluß daran konnte die Extinktion der Proben bei 488 nm bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte entsprechend 12.1.2.

Anmerkung: Diese Bestimmungsmethode eignet sich nicht für genauere Messungen des Kohlenhydratanteils in einer Probe, da Uronsäuren nur 40-50 % der Farbausbeute von Neutralzuckern aufweisen; Aminosucker ergeben mit dem Phenolreagens keine Farbreaktion.

12.5. Test auf reduzierende Gruppen (UV-Test)

Die von Kidby and Dividson (1973) beschriebene Methode wurde in modifizierter Form verwendet.

Reagens: 6.28 g $K_3PO_4 \times 7 H_2O$
14.0 g K_2HPO_4
1.32 g $K_3Fe(CN)_6$
 H_2O ad 1000 ml (kühl in dunkler Flasche aufbewahren)

Standard: 200 µg Glucose/ml.

Durchführung: Zu 1.0 ml der Probe (2-30 µg Glucoseäquivalente) wurden 0,25 ml des Reagens pipettiert und das Gemisch für 5 min auf 100 °C erhitzt. Nach schneller Abkühlung der Proben mit Leitungswasser wurden sie mit je 9.0 ml H_2O gemischt und ihre Extinktion bei 237 nm in Quarzküvetten bestimmt. Die Auswertung erfolgte wie in 12.1.2.

12.6. Quantitative Bestimmung von Acetat

12.6.1. Bestimmung des Gesamtacetats (Bergmeyer 1974)

Die nach der Hydrolyse sofort neutralisierte Probe wurde in einem Aliquot des Testpuffers (s.unten) gelöst und in den Test eingesetzt.

Reagentien: Puffer: 0.1 m Triäthanolamin-Hydrochlorid (1.85g/100 ml)
0.02 m $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (0.4 g/100 ml)
pH 7.4 mit 4 n NaOH eingestellt
ATP-Lösung: 50 mg/ml in 5 % $NaHCO_3$
4 m Hydroxylamin-Hydrochlorid (28 g/100 ml). Kurz vor Gebrauch mit 4 n NaOH neutralisieren.
0.6 m TES (1 g/10 ml H_2O)
0.06 m Fe(III)-Chlorid-Lösung: 1.66 g $FeCl_3 \times 6 H_2O$ in 10 ml HCl konz.lösen, mit H_2O ad 100 ml)
Acetatkinase (AK) (5 mg/ml; Boehringer)
Acetat-Standard: 0,01 m Na-Acetat (136 mg Na-Acetat $\times 3 H_2O$ /100 ml).

Testansatz: 0.50 ml Puffer

0.20 ml ATP

0.20 ml Hydroxylamin

0.10 ml Probe bzw. Acetat-Standard

0.02 ml AK

mischen, genau 30 min bei 35°C inkubieren

1.00 ml Trichloressigsäure-Lösung

4.00 ml Fe(III)-Chlorid-Lösung

mischen, abzentrifugieren, Extinktion des Überstandes der Probe (E_1) und des Standards (E_2) bei 546 nm bestimmen.

Auswertung: $\mu\text{Mol Acetat/Probe} = E_1/E_2$.

12.6.2. Bestimmung estergebundener Acylgruppen (Hestrin 1949)

Diese Bestimmung wurde an unhydrolysierten Proben (Lösungen bzw. Suspensionen) durchgeführt.

Lösungen: A. 2.0 m Hydroxylamin-Hydrochlorid

B. 3.5 n NaOH

C. HCl konz., mit 2 Vol. H_2O verdünnt

D. 0.37 m $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 0.1 n HCl

Standard: 5 μMol Äthylacetat/ml in Methanol

Durchführung: Zu 1.0 ml der Probe (0.05 - 1 μMol estergebundene Acylgruppen) wurden 2.0 ml einer frisch hergestellten Mischung von A/B = 1/1 pipettiert. Nach 1 min wurden je 1.0 ml der Lösungen C und D zugemischt. Zur Kompensation unspezifischer Färbungen wurde eine Parallelprobe mitgeführt, zu der die Reagentien in der Reihenfolge C, A + B, D zugesetzt wurden. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 546 nm, nachdem die Proben (soweit es sich um Suspensionen handelte) abzentrifugiert worden waren. Die korrigierten Extinktionswerte wurden mit Hilfe der Eichgeraden entsprechend 12.1.2. ausgewertet.

12.7. Glycerinbestimmung

Die Bestimmung von Glycerin aus Hydrolysaten erfolgte mit den Reagentien und nach den Angaben in "Biochemica-Testcombination zur Bestimmung von Glycerin und Neutralfett" (Boehringer).

12.8. Gesamtlipide

Der Gehalt an Lipiden in unhydrolysierten Proben wurde mit den Reagentien und entsprechend den Angaben in "Biochemica-Testcombination: Gesamtlipide" (Boehringer) bestimmt.

12.9 Phosphatbestimmung (Chen et al. 1956)

Reagens: 10 ml 6 n H_2SO_4
20 ml H_2O
10 ml 2.5 % Ammonium-Molybdat in H_2O
10 ml 10 % Ascorbinsäure in H_2O

Standard: 10 $\mu\text{g PO}_4^{3-}$ /ml (1.433 g KH_2PO_4 /l; 1 : 100 verdünnen)

Durchführung: Die Proben wurden in sorgfältig vorgereinigten (Behandlung mit EDTA-Lösung) großen Reagensgläsern mit 1 ml 6 n H_2SO_4 erhitzt, bis Schwarzfärbung auftrat und weiße Nebel entstanden (Abzug !). Darauf wurde solange in Portionen von je 0,2 ml H_2O_2 zugegeben und wieder erhitzt, bis die Lösung klar und farblos wurde. Dieses Gemisch wurde mit H_2O auf 15 ml aufgefüllt und davon ein Aliquot (2-25 $\mu\text{g PO}_4^{3-}$) im Test eingesetzt.

Testansatz: 4.0 ml Probe
4.0 ml Reagens
bei 37°C für 2 h inkubieren, dann Extinktionen bei 820 nm gegen eine Blindprobe (H_2O anstatt Probelösung) bestimmen.

Ein 1:1-Gemisch von H_2O und Reagens diente ebenfalls dazu, Proben mit zu hohen Extinktionen zu verdünnen. Die Auswertung mit Hilfe der Eichgeraden erfolgte wie in 12.1.2.

12.10. Bestimmung von freiem anorganischen Sulfat

12.10.1. Rhodizonat-Methode (Farbtest) (Terho and Hartiala 1971)

Lösungen: A. BaCl_2 -Puffer: 10 ml 2 n Essigsäure
2 ml 0.0075 m BaCl_2 -Lösung
8 ml 0.02 m NaHCO_3 -Lösung
80 ml Äthanol

B. Reagens: 5 mg Na-Rhodizonat (Merck) in 20 ml H_2O lösen, dann 100 mg L-Ascorbinsäure zugeben, lösen und mit 80 ml Äthanol mischen.

Standard: 50 $\mu\text{g SO}_4^{2-}$ /ml (64.14 mg $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}/500$ ml).

Durchführung: 0.5 ml der Probe (1-15 $\mu\text{g SO}_4^{2-}$) wurden mit 2.0 ml Äthanol und 1.0 ml des Puffers A gemischt. Darauf wurden 1.5 ml Reagens B zugegeben, gemischt und nach 10 min Stehen im Dunkeln bei RT die Extinktion der Proben bei 520 nm bestimmt.

Auswertung: Die Extinktionen, die zur Auswertung nach 12.1.2. notwendig waren, wurden dadurch ermittelt, daß die jeweilig gemessene Extinktion der Probe von der Extinktion des O-Wertes (0.5 ml H_2O anstatt Probe) abgezogen wurde.

Anmerkung: Diese Methode eignete sich sehr gut zur Bestimmung des freien Sulfats in Hydrolysaten. Bei Anwesenheit von polymerem Material (Polyanionen) kam es zu unspezifischen Farbreaktionen.

12.10.2. Nephelometrische Methode (Modifikation der Methode von Dodgston and Price 1962)

Reagens: 2 g Gelatine (Merck) wurden in 400 ml H_2O bei einer Temperatur von 60-70°C gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C stehen gelassen, dann wurden 2 g $BaCl_2$ zugegeben und für 3 h bei RT gerührt. Nachdem die Lösung für etwa 24 h bei 4°C aufbewahrt worden war, wurde niedertourig abzentrifugiert, so daß der Überstand eine sehr schwache, jedoch noch wahrnehmbare Trübung zeigte. Im Überstand wurden nochmals 2 g $BaCl_2$ gelöst und anschließend das pH des Reagens mit 2 n HCl auf 2.0-2.5 eingestellt.

Standard: wie in 12.10.1.

Durchführung: Zu 0.5 ml der Probe ($1-20 \mu g SO_4^{2-}$) wurde 1.0 ml des Reagens gegeben, gemischt und nach 10 min die Trübung in Halbmikroküvetten mit 2 cm Lichtweg bei 366 nm gegen H_2O bestimmt (E_1). Jedes der Probengemische wurde anschließend abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge) und die Extinktion des Überstands bei 366 nm gemessen (E_2).

Auswertung: Der bei 366 nm gemessene Wert E_1 setzt sich aus mehreren Faktoren zusammen (Extinktionen des Reagens und der Probe, Trübung des Reagens, Trübung der Probe aufgrund des Sulfatgehalts); für die Auswertung mit Hilfe der Eichgeraden (entsprechend 12.1.2.) ist jedoch nur die Trübung, die dem Sulfatgehalt der Probe entspricht, maßgebend. Die dem Sulfatgehalt äquivalente Trübung (T_{Probe}) wurde deshalb folgendermaßen errechnet:

$$T_{Probe} = (E_1 - E_2) - T_{Reagens}$$

T_{Reagens} wurde ermittelt aus: $E_1^{\text{O-Probe}} - E_2^{\text{O-Probe}}$;

Die O-Probe enthielt anstatt der Standardlösung 0.5 ml H_2O .

Anmerkung: Die Menge an estergebundenem Sulfat in einer Probe wurde dadurch bestimmt, daß das freie anorganische Sulfat einmal in einem hydrolysierten und einmal in einem unhydrolysierten Aliquot der Probe bestimmt wurde. Esterartig gebundenes Sulfat ergibt keine Fällung mit BaCl_2 .

12.11. Bestimmung des Trockengewichts

Eine genau eingewogene Menge der Probe wurde in einer Trockenspietole über P_{205} (Ölpumpen-Vacuum) für 24 h bei 90°C getrocknet. Nach dem Abkühlen erfolgte sofort die Wägung der getrockneten Probe.

12.12. Aschebestimmung

Die bei 105°C vorgetrockneten Proben wurden in Platintiegeln im Muffelofen bei 520°C verascht. Anschließend erfolgte die Wägung des Ascherückstandes.

13. Dinitrophenylierung

13.1. Präparative Dinitrophenylierung von Zellwänden (Takebe 1965)

20 mg ZW wurden durch Ultraschallbehandlung in 10 ml 1.25 % (w/v) NaHCO_3 -Lösung suspendiert. Nach Zugabe von 20 ml einer frisch zubereiteten 1.5 % (v/v) äthanolischen Lösung von 1-Fluor-2.4-Dinitrobenzol wurde das Gemisch 6 h bei 37°C geschüttelt. Die dinitrophenylierten Zellwände wurden bei 40 000 g abzentrifugiert, nacheinander mit Äther (3 x), 96 % Äthanol, 50 % Äthanol, zuletzt mit H_2O gewaschen und schließlich gefriergetrocknet.

13.2. Dinitrophenylierung von Zellwänden für den dünnsschicht-chromatographischen Nachweis (Araki et al. 1972)

Die Proben (5 mg ZW bzw. 1 mg Aminozucker) wurden in 0.5 ml 4 % (v/v) Trimethylamin suspendiert bzw. gelöst, mit je 0.5 ml 5 % (v/v) äthanolischer 1-Fluor-2.4-Dinitrobenzol-Lösung und Äthanol versetzt und für 12 h bei 30°C im Dunkeln geschüttelt. Anschließend wurden zum Gemisch 3-5 ml Äther zugegeben und ausgeschüttelt. Die Ätherphase wurde verworfen und die wässrige Phase nochmals mit

Äther extrahiert. Nach Abzentrifugieren bzw. Abblasen der wässrigen Phase erfolgte Hydrolyse (s.8.1.1.). Die dinitrophenylierten Aminosucker konnten nach Dünnschichtchromatographie in Puffer IV als stark im UV absorbierende Flecken nachgewiesen werden.

14. Abbau von Aminoexosen mit Ninhydrin (Stoffyn 1959)

Freie Aminosucker aus ZW-Hydrolysaten ließen sich mit Ninhydrin zu den entsprechenden Pentosen abbauen. Die Hydrolysate wurden in 2 ml H_2O gelöst, mit Pyridin neutralisiert und nach Zugabe von 4 mg Ninhydrin für 30 min auf $100^\circ C$ erhitzt. Nach Abblasen der Gemische wurde in wenig H_2O aufgenommen, der Farbstoff abzentrifugiert und der Überstand papierchromatographisch untersucht.

15. Acetylierung der freien Aminogruppen von Aminosuckern (N-Acetylierung)

15.1. Präparative N-Acetylierung (Heyman et al. 1964)

100 mg wasserlösliches ZW-Material wurden in 50 ml H_2O gelöst. Nach Lösung von 4.2 $NaHCO_3$ wurden 3 ml Essigsäureanhydrid zugegeben und das Gemisch in einem unverschlossenen Gefäß über Nacht bei $4^\circ C$ inkubiert. Zur Entfernung der restlichen Reagentien wurde das Inkubationsgemisch für 2 Tage gegen H_2O dialysiert und anschließend gefriergetrocknet (ZW solub/Nac).

15.2. N-Acetylierung für analytische Zwecke (Wheat 1966)

Die Probe (0.02-5 μMol Aminosucker) wurde in 0,1-1 ml H_2O gelöst und mit 0,1 Vol. einer gesättigten $NaHCO_3$ -Lösung sowie 0.1 ml einer 2 % (v/v) Lösung von Essigsäureanhydrid in Aceton versetzt. Nach etwa 5 min wurde das Reaktionsgemisch angesäuert, kurz erhitzt und dann abgeblasen.

16. Entfernung der N-Acetylgruppen (De-N-Acetylierung)

16.1. De-N-Acetylierung durch Alkalibehandlung

ZW-Material wurde über Nacht bei $60^\circ C$ mit 2 n NaOH (5 mg ZW/ml) inkubiert. Das polymere Material wurde nach Abzentrifugation der Inkubationslösung durch Zugabe von 4 Vol. tiefgeköhltem Äthanol ($-18^\circ C$) zum Überstand ausgefällt. Nach Lösen in H_2O und anschließender Fällung mit Äthanol konnte ein wasserlösliches ZW-Polysaccharid erhalten werden, dessen Aminosucker zu etwa 40 % freie Aminogruppen aufwiesen.

16.2. De-N-Acetylierung durch Hydrazinolyse

16.2.1. Herstellung von wasserfreiem Hydrazin (Fraenkel-Conrat and Chun Ming Tsung 1967)

100 ml Hydrazin (etwa 100 %; Merck) wurden unter Schütteln mit 1 l Toluol und 1 kg Calciumoxid versetzt und über Nacht stehen gelassen. Die Mischung wurde darauf 3 h unter Rückflußkühlung gekocht und unter Ausschluß von Feuchtigkeit anschließend destilliert (Siedepunkt des azeotropen Gemisches von Hydrazin und Toluol : 90-91°C). Aus der Vorlage konnte das wasserfreie Hydrazin in getrocknete Schliffkolben überführt und zur Aufbewahrung im Exsiccator eingefroren werden.

16.2.2. Entfernung der N-Acetylgruppen mit Hydrazin (Gmeiner et. al. 1969)

100 mg der ZW wurden über P_2O_5 im Exsiccator vorgetrocknet und zusammen mit 5 ml wasserfreiem Hydrazin in eine Ampulle eingeschmolzen. Die Inkubation des Gemisches erfolgte für 10 h bei 100°C. Überschüssiges Hydrazin wurde darauf über H_2SO_4 konz. im Vacuum (Ölpumpe) abgedampft. Der Rückstand wurde in H_2O gelöst und für 48 h unter mehrfachem Wasserwechsel dialysiert. Nach Gefriergetrocknung des Dialysates konnte das partiell de-N-acetylierte (etwa 80-90 % der Aminozucker wiesen freie Aminogruppen auf) wasserlösliche Polymer in einer Ausbeute von etwa 70 % der eingesetzten ZW-Menge erhalten werden.

17. Entfernung des estergebundenen Sulfats aus der Zellwand

17.1. Desulfatisierung mit Pyridin in Dimethylsulfoxid (Choi and Meyer 1975)

10 mg der wasserlöslichen ZW wurden über eine kleine Säule (5 ml) von Dowex 50 H^+ gegeben und mit 30 ml H_2O eluiert. Das Eluat wurde in einem eisgekühlten Kolben mit 0,1 ml Pyridin aufgefangen und anschließend einrotiert. Das so erhaltene Pyridinium-Salz der ZW wurde sorgfältig über $CaCl_2$ im Exsiccator getrocknet und anschließend mit 1 ml einer 2 % (v/v) Lösung von Pyridin in Dimethylsulfoxid in ein Röhrchen eingeschmolzen. Nach 15 min bei 60°C wurde die Lösung für 9 h bei 100°C inkubiert. Zur Entfernung des Lösungsmittels erfolgte darauf Dialyse unter mehrfachem Wasserwechsel für 48 h. Nach Gefriergetrocknung des Dialysats konnte die

partiell desulfatisierte ZW (Sulfatgehalt: 20 % des ursprünglichen estergebundenen Sulfats) in einer Ausbeute von etwa 90 % erhalten werden (ZW solub/desulf).

17.2. Desulfatisierung mit methanolischer HCl (Miyaji and Misaki 1973)

Diese Methode wurde in Fällen angewendet, in denen eine Desulfatisierung nach der obigen Methode ungeeignet war (Oligosaccharide, ZW-Präparationen mit freien Aminogruppen).

17.2.1. Herstellung von methanolischer HCl (Kantor and Schubert 1957)

Das durch Auftropfen von H_2SO_4 konz. auf NaCl in einer Kipp-Apparatur erhaltene HCl-Gas wurde durch eine Waschflasche mit H_2SO_4 konz. geleitet und schließlich durch wasserfreies Methanol geparlt. Die Absolutierung von Methanol erfolgte durch Zusatz von 5 g Mg-Späne/l, 3-stündigem Kochen der Mischung unter Rückflußkühlung und anschließender Destillation (Aufbewahrung über Molekularsieb 3 Å).

Die Normalität der methanolischen HCl-Lösung wurde durch Titration eines Aliquots gegen 0.1 n NaOH bestimmt. Es wurde eine 3 n HCl (etwa 11 % w/v) in Methanol erhalten.

17.2.2. Desulfatisierung

Die Hydrolyse von Sulfat-Estern an äquatorialen sekundären Hydroxylgruppen konnte durch Inkubation der Proben mit 1 % (w/v) methanolischer HCl bei RT für 6 Tage erreicht werden; glycosidische Bindungen bleiben dabei weitgehend erhalten. Das Inkubationsgemisch wurde anschließend mit wenigen Tropfen Ammoniak versetzt und dann abgeblasen.

18. Reduktion der Uronsäuren zu den entsprechenden Neutralzuckern

18.1. Reduktion der Carbodiimid-aktivierten Carboxylgruppen im Zellwandpolymer (Taylor and Conrad 1972)

100 mg wasserlösliche ZW wurden in 10 ml H_2O gelöst. Das Inkubationsgefäß (hochwandiges Becherglas, 25 ml) wurde mit einem Magnetrührer versehen und in die Lösung eine Mikro-pH-Elektrode

getaucht, die mit einem Digital-pH-Meter (Orion Research Model 701) verbunden war. Mit 0,1 n HCl wurde das pH der Lösung auf 4.75 eingestellt und anschließend 200 mg (etwa 1 mMol) 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (Sigma) zugegeben. Durch laufende Zugabe von 0,1 n HCl mit Hilfe einer 20 µl-Eppendorf-pipette konnte das pH des Inkubationsgemisches (Protonenverbrauch der Reaktion) konstant bei etwa 4.75 ($\pm$ 0,15) gehalten werden. Nachdem keine Protonenaufnahme mehr feststellbar war (2 h) wurde die Lösung in einem Kolben bei 50°C (Wasserbad) langsam unter Rühren (Magnetrührer) mit 20 ml einer 2 m NaBH₄-Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 50°C wurde das Gemisch in Eis gekühlt, das überschüssige NaBH₄ durch vorsichtige Zugabe von Eisessig zerstört, die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt und schließlich gegen H₂O dialysiert. Die dialysierte und getrocknete Probe wurde darauf einer weiteren Reduktion entsprechend den obigen Bedingungen unterworfen. Nach der folgenden Dialyse wurde das reduzierte ZW-Material gefriergetrocknet (ZW-solub/red).

Wasserunlösliche ZW konnte unter denselben Bedingungen reduziert werden. Anstelle der Dialyse wurde die Suspension nach Reduktion abzentrifugiert, 3 x mit H₂O gewaschen und dann in H₂O resuspendiert.

18.2. Reduktion der Uronsäuren in Oligosacchariden mit NaBH₄ nach vorausgehender Lactonisierung

Durch Abblasen der trockenen Probe mit 0,5 ml 1 n HCl bei etwa 40°C konnte eine Lactonisierung (3.6-Lacton) der im Oligosaccharid enthaltenen Uronsäuren erreicht werden. Die Reduktion der Uronsäurelactone zum entsprechenden Neutralzucker wurde durch Inkubation der Probe mit 10 mg NaBH₄ in 0,01 m Boratpuffer pH 7.5 für 1 h bei RT durchgeführt. Überschüssiges NaBH₄ wurde mit Eisessig zerstört, die Probe anschließend 4 x mit Methanol abblasen und der Rückstand zur Analyse der Neutralzucker hydrolysiert.

19. Überführung der Uronsäurelactone in die freie Säureform (Ernst 1968)

Da ein Teil der Uronsäuren (insbesondere Glucuronsäure, Mannuronsäure, Iduronsäure) bei saurer Hydrolyse stabile Lactone bildet,

wurde in all den Fällen, in denen die freie Säureform erforderlich war, das Hydrolysat delactonisiert. Die neutrale Probe (Hydrolysat) wurde in 1 ml H_2O gelöst und nach Zugabe von 25 μ l 2 n NaOH für 15 min bei RT inkubiert. Darauf erfolgte Zugabe von 30 μ l 2 n Essigsäure. Die entlactonisierte Probe wurde anschließend abgeblasen und in einem Aliquot H_2O wieder gelöst.

20. Perjodatoxidation von Zellwandmaterial

20.1. Allgemeine Bedingungen

Die Oxidation von ZW-Material konnte sowohl mit wasserunlöslichen wie löslichen Proben durchgeführt werden. Die Bedingungen der Perjodatbehandlung wurden mehrfach variiert und sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt:

a) Inkubationsgemisch:

$NaJO_4$ -Lösung : 0,05 m bzw. 0.1 m;

Pufferbedingungen: ungepuffert; 0.05 m Acetat pH 4.5, 5.5;
0,01 m Phosphat pH 7.0;

ZW-Konzentration: 2.5 - 5 mg/ml.

In der Regel wurde dem Inkubationsgemisch $NaClO_4$ als inerte Elektrolyt in einer Konzentration von 0.2 m zugegeben.

b) Inkubationsbedingungen:

Die Inkubation des Gemisches erfolgte im Dunkeln bei RT (24-48 h) bzw. bei 4°C (48-100 h). Überschüssiges Perjodat wurde durch Zugabe von Äthylenglycol (0,1 ml/2 ml Inkubationslösung) zerstört und die Lösung erschöpfend gegen H_2O dialysiert. Bei Suspensionen wurde das oxidierte unlösliche Material anstelle der Dialyse mehrfach mit H_2O gewaschen.

c) Messung des Perjodatverbrauchs:

Die Abnahme der Perjodatkonzentration im Inkubationsgemisch konnte spektrometrisch bestimmt werden (Grado and Ballou 1961). Dem Inkubationsgemisch wurden zu entsprechenden Zeiten jeweils 20 μ l entnommen, mit 2,0 ml H_2O gemischt und die Extinktion in Quarzküvetten bei 260 nm bestimmt. Mit Hilfe einer Eichgeraden (gute Linearität im Bereich von 0,005-0.1 m JO_4^-) konnte daraus die entsprechende Perjodatkonzentration ermittelt werden.

2o.2. "Smith-Abbau" (Spiro 1966)

Das nach Perjodatbehandlung erhaltene oxidierte Polysaccharid wurde in 0,1 m Boratpuffer pH 8.4 gelöst und mit 0.1 m NaBH_4 für 3 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Eisessig zur Zerstörung des überschüssigen Borhydrids wurde über Nacht gegen H_2O dialysiert und dann abgeblasen. Die darauf folgende Hydrolyse erfolgte in 0,05 n H_2SO_4 bei 80°C für 1 h; anschließend wurde mit Ammoniak neutralisiert, abgeblasen und die Probe erneut in einem Aliquot des Inkubationspuffers aufgenommen. Der darauf folgende Oxidationszyklus mit NaJO_4 erfolgte wie in 2o.1.

21. Spezifische Zerlegung des Zellwandpolymers in Spaltprodukte unterschiedlicher Größe

21.1. Behandlung der Zellwand mit Salpetriger Säure

100 mg der (partiell) de-N-acetylierten ZW (s.16.) wurden in 20 ml H_2O gelöst und mit je 20 ml 33 % Essigsäure und 5 % NaNO_2 für 3 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von etwa 100 ml eiskaltem Methanol wurde das Gemisch am Rotationsverdampfer auf etwa die Hälfte des Volumens eingeeengt, dann mit weiterem Methanol bis auf ein Volumen von etwa 20 ml einrotiert. Nach einer weiteren Zugabe von Methanol wurde bis zur Trockene einrotiert und der Rückstand in H_2O gelöst. Zur weiteren Aufarbeitung wurde die hochviskose Lösung (Na-Acetat !) entweder entsalzt, (s.1o.1.1.) oder die Probe durch Abblasen soweit eingeeengt, daß gerade noch eine vollständige Lösung des Materials möglich war. Über Nacht kristallisierte bei 4°C in der Regel ein Teil des Salzes aus, so daß der (teilweise entsalzte) Überstand für die weitere Aufarbeitung benutzt werden konnte.

21.2. Auftrennung der Spaltprodukte durch Gelfiltration

Die Trennung der erhaltenen ZW-Bruchstücke erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Säulen: 2 hintereinander-geschaltete Säulen von

A. Sephadex G-50 (80×2.3 cm)

B. Sephadex G-25 (130×2.3 cm).

Ausschlußvolumen des Säulensystems : etwa 330 ml.

Elutionspuffer: 0,02 m Triäthylamin-/Carbonatpuffer pH 7.8.

Elutionsgeschwindigkeit: 2 ml/min

Fraktionsvolumen: 5 ml.

Auf die Säule A wurden 1.5 - 2 ml der vollständig oder nur teilweise entsalzten Probe aufgetragen. Die Fraktionierung erfolgte über ein Uvicord III-Kollektorsystem (LKB, Stockholm) mit begleitender UV-Absorptionsmessung bei 206 nm. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Uronsäure- und Anhydrosuckergehalt getestet und anschließend entsprechend dem erhaltenen Peakmuster vereinigt. Vereinigte Fraktionen wurden zur Entfernung des Puffers 3 x mit H_2O bis zur Trockene einrotiert und schließlich in einem definierten Aliquot an H_2O wieder gelöst.

Die quantitative Bestimmung des Anhydrosuckergehalts der jeweiligen Sammelfractionen erfolgte mit folgender Modifikation der in 12.1.4. beschriebenen Methode (Cifonelli 1968) : 0,2 ml der Probe wurden mit 0.2 ml 1 % $NaBH_4$ -Lösung in 1 n Ammoniaklösung für 1 h bei RT inkubiert (Blindprobe). Überschüssiges $NaBH_4$ wurde anschließend mit 0.1 ml Eisessig zerstört. Einer Parallelprobe wurden dieselben Reagentien zugesetzt, wobei jedoch die Essigsäure vor der $NaBH_4$ -Zugabe zupipettiert wurde. Zu jeder der Proben wurden dann 1.5 ml einer 1/1/1-Mischung von H_2O /33 % Essigsäure/5 % $NaNO_2$ gegeben und entsprechend 12.1.4. weiterverfahren.

22. Fällung und Fraktionierung von solubilisierter Zellwand mit Cetyltrimethyl-ammoniumbromid (CTAB, Cetavlon).

10 mg wasserlöslicher ZW (solubilisiert nach 5.1.) wurden in 2 ml H_2O gelöst und mit einer Lösung (10 % w/v) von Cetavlon in H_2O (3 mg/mg ZW) versetzt. Nach kurzer Inkubation (30 min) bei 37°C wurde der ausgeflockte CTAB-ZW-Komplex abzentrifugiert und mit H_2O gewaschen. Das Sediment der Cetavlon-Fällung wurde in 1 m KCl gelöst (1 ml) und soviel H_2O zugegeben, daß eine 0.4 m KCl-Lösung resultierte. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde das ausgeflockte Material wiederum abzentrifugiert, das Sediment mit 0.4 m KCl-Lösung gewaschen, Überstand und Waschwasser vereinigt. Die Lösung des gewaschenen Sediments erfolgte in 1 m KCl; durch Zugabe von H_2O wurde eine Konzentration von 0.9 m KCl erzielt. Das entstandene Sediment wurde gewaschen (0.9 m KCl) und in 1.5 m KCl anschließend gelöst. Alle erhaltenen Eluate (Zentrifugationsüberstände und Waschlösungen) wurden abgeblasen, in je 1 ml H_2O gelöst und dann analysiert.

Anmerkung: Die Auflösung des CTAB-ZW-Komplexes darf bezüglich der Salzkonzentration nicht in zu kleinen Schritten erfolgen, da sonst keine Ausflockung des Komplexes erfolgt sondern nur kolloidartige schwer zentrifugierbare Trübungen auftreten. Zur Entfernung von Cetavlon aus der Lösung sind mehrere Verfahren möglich. Bei polymerem Material eignet sich vor allem die Fällung des Polyanions mit Äthanol. Cetavlon kann aus Lösungen mit Jodid (z.B. KJ) oder Rhodanit (SCN^-) ebenfalls gefällt werden.

23. Methylierungsanalyse.

Die Methylierungsanalysen wurden mit verschiedenen wasserlöslichen (s.5.2.) ZW-Präparationen durchgeführt, die im Anschluß an die Solubilisierung N-acetyliert worden waren (s.15.1.):

- a) ZW unbehandelt
- b) ZW desulfatisiert (s.17.1.)
- c) ZW Carboxyl-reduziert (s.18.)
- d) ZW Carboxyl-reduziert und anschließend desulfatisiert.

23.1. Elektrodialyse des Zellwandmaterials(Galanos and Lüderitz 1975)

50 mg des ZW-Materials wurden in etwa 5 ml H_2O gelöst und in die mittlere Kammer der Dialyseapparatur (Model SM 16531, Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen) pipettiert. Die durch eine Dialysmembran davon abgetrennten Kathoden- bzw. Anodenkammern wurden zur Kühlung während der gesamten Elektrodialyse kontinuierlich mit eisgekühltem H_2O durchspült. Nach einer Dialysedauer von etwa 3 Stunden (Spannung 100 V, Stromstärke 100 mA) war das pH der dialysierten Lösung von 8 auf etwa 2.5 gesunken. Das so erhaltene ZW-Material (Säureform der ZW) wurde anschließend gefriergetrocknet

23.2. Methylierung der Zellwand-Präparationen (Hakomori 1964)

23.2.1. Lösung der Zellwände in DMSO

10 mg der elektrodialysierten ZW-Präparationen wurden in 5 ml-Penicillingläschen eingewogen und mit einem in eine Glaskapillare eingeschmolzenen Magnetstäbchen als Rührstab versehen. Nach Zugabe von 0.4 ml absolutem Dimethylsulfoxid wurde das Gläschen

10 sec mit Stickstoff gespült und dann sofort mit einer Teflon-beschichteten Verschlusskapsel versiegelt (die speziellen Gläschen, Verschlusskapseln, Verschluss- und Öffnungszange wurden von der Fa. Machery-Nagel, Düren, bezogen). Die Proben wurden für etwa 1 h gerührt, dazwischen für wenige Minuten im Ultraschallbad beschallt. In der Regel wurde auf diese Weise eine vollständige Lösung der ZW in DMSO erreicht. In einigen Fällen konnte eine vollständige Lösung erst dadurch erzielt werden, daß dem Gemisch geringe Spuren von p-Toluolsulfonsäure zugesetzt wurden (E.Rietschel, pers. Mitteilung).

23.2.2. Herstellung des Methylsulfinyl-Carbanions (MSC)

(Corey and Chaykovsky 1962)

50 mg NaH (Dispersion in Öl 55-60 %; Fluka) wurden in ein Penicillingläschen eingewogen und mit einem Rührstab (s.o.) versehen. Nach Zugabe von 1 ml DMSO wurde 10 sec mit N_2 gespült und das Gefäß darauf sofort versiegelt. Die Suspension wurde auf einem heizbaren Magnetrührer für 1 h bei 50-70°C gerührt, der entstehende Gasüberdruck durch regelmäßiges Durchstechen der Verschlusskappe mit einer Injektionsnadel abgelassen. Gegen Ende der Reaktion färbte sich das Gemisch schwach grünlich und klarte auf; die H_2 -Entwicklung kam dabei zum Stillstand.

23.2.3. Methylierung

Zu der in 0.4 ml DMSO gelösten ZW wurde mit Hilfe einer Injektionsspritze (1 ml) 0.4 ml der MSC-Lösung tropfenweise zugegeben. Es bildete sich ein Gel, dessen Viskosität am Ende der Zugabe jedoch wieder abnehmen sollte. Das Gemisch wurde für 4 h bei RT gerührt, so daß man eine leichtflüssige, vollständig klare Lösung erhielt. Die Probe wurde darauf in Eis gekühlt (Gelbildung) und mit einer Injektionsspritze tropfenweise unter Schwenken des Reaktionsgemisches (Vermeidung lokaler Überhitzung) 0.3-0.4 ml Methyljodid (Roth) zugegeben. Das Inkubationsgemisch wurde in der Regel über Nacht bei RT gerührt.

23.2.4. Isolierung des methylierten Polysaccharids

Die schnelle und sehr effektive Reinigung des methylierten Polysaccharids durch Gelfiltration über eine Sephadex LH-20-Säule (1 x 20 cm) (Elution mit Chloroform, Fraktionierungsvolumen 1 ml) brachte bei methylierten ZW-Präparationen relativ hohe Verluste (50-60 % des zur Methylierung verwendeten Materials). Alternativ dazu wurde das Methylierungsgemisch für 24 h gegen H₂O bei 37°C unter mehrfachem Wasserwechsel dialysiert. Nach Gefriertrocknung konnte das methylierte Material praktisch quantitativ erhalten werden.

23.2.5. Kontrolle des Methylierungsgrades durch IR-Spektroskopie

Etwa 2 mg des methylierten Materials wurden in wenig trockenem Chloroform gelöst und auf NaCl-Platten zur IR-Spektroskopie aufgetrocknet. Nach Verflüchtigung des Lösungsmittels wurde das IR-Spektrum aufgenommen. Die Abwesenheit der OH-Absorptionsbande bei 3200-3600 cm⁻¹ deutete auf quantitative Methylierung hin. Anschließend konnte das Probenmaterial durch Abspülen der NaCl-Platten mit Chloroform wiedergewonnen werden.

23.2.6. Wiederholung der Methylierung

Partiell methyliertes ZW-Material löste sich sehr gut in DMSO und wurde entsprechend den obigen Angaben nochmals methyliert und anschließend aus dem Reaktionsgemisch durch Dialyse isoliert.

23.3. Hydrolyse der permethylierten Zellwandpräparationen

(Stellner et al. 1973)

3 mg der permethylierten Zellwände wurden mit 0.3 ml einer 0.5 n H₂SO₄-Lösung in 95 % Essigsäure (5 ml 10 n wässrige H₂SO₄ + 95 ml Eisessig) über Nacht (etwa 14 h) bei 80°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.3 ml H₂O wurde die Hydrolyse bei 80°C für 5 h fortgesetzt. Das Hydrolysat wurde darauf über eine kleine Säule (Pasteur-Pipette) von Amberlite IR-45 Acetatform gegeben und die Säule mit 2 ml Methanol nachgewaschen. Das erhaltene Eluat wurde am Rotationsverdampfer in Fiolax-Röhrchen (10 x 100mm) zur Trockene gebracht.

23.4. Reduktion und Acetylierung der partiell methylierten Zucker

Die trockenen Hydrolysate wurden in 0.2 ml H_2O gelöst und nach Zugabe von 0.1 ml $NaBH_4$ -Lösung (10 mg/0.1 ml) bei RT über Nacht inkubiert. Überschüssige $NaBH_4$ wurde durch Zugabe von etwas Eisessig zerstört und die Lösung bei RT zur Trockene abgeblasen. Borsäure wurde durch 4-maliges Abblasen des Rückstandes mit Methanol (je 0.8 ml) als Methylester entfernt. Die getrocknete Probe wurde darauf durch Inkubation mit 0.3 ml Acetanhydrid für 2 h bei $100^\circ C$ peracetyliert. Nach mehrfachem Abblasen des Acetylierungsgemisches mit H_2O wurde die Probe in 0.7 ml H_2O gelöst und 2 x mit je 0.7 ml Chloroform extrahiert. Zuletzt wurden die Chloroform-Phasen abgeblasen und der erhaltene Rückstand für die Gaschromatographie in 50 μl Chloroform gelöst.

23.5. Analyse der partiell methylierten Alditolacetate

23.5.1. Gaschromatographie

Ein Aliquot der Proben (0.5 - 1 μl) wurde in den Gaschromatographen eingespritzt. Folgende innere Standards wurden in Parallel-läufen zur Bestimmung der Peak-Retentionszeiten zugemischt:

2.3.4.6-Tetra-O-Methyl-1.5-Di-O-Acetyl-Glucitol ($t_R = 1.0$) und
2.3-Di-O-Methyl-1.4.5.6-Tetra-O-Acetyl-Glucitol ($t_R = 5.39$).

Technische Daten zur Gaschromatographie:

Gerät: Varian Aerograph 1400 mit Flammenionisationsdetektor.

Säule: Glassäule (0.32 x 200 cm) gefüllt mit 3 % ECNSS-M auf
Gaschrom Q (100-120 mesh).

Temperatur: $135^\circ C$ isotherm; nach 32 min $170^\circ C$ isotherm.

Trärgas: Stickstoff.

23.5.2. Gaschromatographie kombiniert mit Massenspektrometrie (GC/MS)

Gerät: Finnigan Model 3200 E GC/MS-System.

Säule: Glassäule (2 mm innerer $\varnothing$; Länge: 5 ft) mit 3 % ECNSS-M
aus Gaschrom Q (100-120 mesh).

Temperatur: $155^\circ C$ isotherm, nach 6 min $2^\circ C/min$ bis $190^\circ C$.

Ionisierungsenergie: 70 eV

Ionisationsstrom: 0.5 mA

Ionenquellen-Temperatur: $50^\circ C$

Trärgas: Helium

23.5.3. Auswertung der gaschromatographischen Ergebnisse

Die Retentionszeiten der einzelnen Peaks wurden unter Verwendung der beiden inneren Standards mit den von Björndal et al. (1970) publizierten Werten korreliert und mit den entsprechenden Massenspektren verglichen. Zur quantitativen Auswertung wurden die Peakflächen nach der Halbwertsmethode (Netto-Höhe $h \times \text{Breite bei } h/2$) berechnet.

24. Spektroskopische Methoden

24.1. Bestimmung der optischen Drehung von Polysacchariden

Die spezifische optische Rotation einer wässrigen Lösung von solubilisierter, N-acetylierter ZW wurde mit Hilfe eines Perkin-Elmer Polarimeters Model 141 bestimmt. Der $[\alpha]_D^{20}$ -Wert wurde nach folgender Formel errechnet:

$$[\alpha]_D^{20} (\text{H}_2\text{O}) = \frac{\alpha \times V \times 100}{l \times c} ; \quad \begin{array}{l} \alpha = \text{gemessene Drehung im Polarimeter bei } 589 \text{ nm} \\ V = \text{Volumen der Messküvette (1 cm}^3\text{)} \\ l = \text{Länge der Messküvette (0.999 dm)} \\ c = \text{Konzentration der ZW [g/100 ml]} \end{array}$$

24.2. IR-Spektroskopie

24.2.1. IR-Spektren von KBr-Presslingen

3 mg der über P_2O_5 vorgetrockneten Probe wurden mit 300-400 mg KBr (Uvasol; Merck) homogen verrieben und davon ein Pressling hergestellt. Die Spektren wurden mit einem Beckman IR-Spektrometer IR-33 aufgenommen.

24.2.2. IR-Spektren von Folien

Von einer Suspension bzw. Lösung der Probe in H_2O wurden nach Trocknen im Vakuum Folien erhalten und mit einem Perkin-Elmer 325 IR-Spektrometer die Spektren aufgenommen.

25. Bestimmung der anomeren Konfiguration von Zuckern durch CrO_3 -Oxidation (Hoffman et al. 1972)

10 mg der elektrodialysierten ZW-Präparation (ZW unbehandelt, s.23.1.) wurden in 1 ml Formamid gelöst und mit 0.5 ml Pyridin

und 0.45 ml Essigsäureanhydrid für 24 h bei RT inkubiert (Peracetylierung). Das Gemisch wurde anschließend unter Eiskühlung mit H_2O verdünnt und gegen H_2O erschöpfend dialysiert. Die ZW wurde nach einer weiteren Peracetylierung in Eisessig gelöst und in 2 Parallelproben unterteilt (je 1 ml). Eine der Proben wurde mit 20 mg CrO_3 versetzt, beide Proben anschließend für 2 h bei 50°C im Ultraschallbad inkubiert. Nach Dialyse der Lösungen wurde die Zuckerzusammensetzung in beiden Proben quantitativ bestimmt.

C. Ergebnisse

1. Zur Charakterisierung von Halococcus morrhuae

1.1. Wachstumsbedingungen und Morphologie

Die Massenkultur der Halococcus-Stämme erfolgte in der für extrem halophile Kokken optimalen Salzkonzentration von 4 m NaCl; der relativ hohe Bedarf an Mg^{++} ist ebenfalls für alle extrem halophilen Bakterien charakteristisch (Larsen 1973). Die Art der komplexen Anteile im Nährmedium erwies sich insofern von Bedeutung, als ein Wachstum in hoher Zellausbeute nur mit Trypton/Hefeextrakt (Oxoid bzw. Difco) nicht dagegen mit Pepton/Hefeextrakt (Merck) erzielt werden kann.

Im Gegensatz zu den Halobakterien, die in der Regel bei einer Temperatur von 37°-40°C gezüchtet werden, zeigten Schüttelkulturen der Halokokken-Stämme kein oder nur sehr geringes Wachstum bei 37°C, sehr gute Zellausbeuten jedoch nach Inkubation bei 30°C. Die Berechnung der Generationszeit mit Hilfe der Wachstumskurve (Abb.2) zeigte, daß die Halokokken in der logarithmischen Phase 1 Teilung/24 h durchführen.

Der Zelltypus des Stammes CCM 859 erwies sich im Gegensatz zu den beiden anderen Stämmen in gewisser Weise abhängig von der Wachstumsdauer der Zellen: während in der logarithmischen Phase die für Halococcus charakteristischen Zelltetraden (vgl. frühere Bezeichnung: Micrococcus bzw. Sarcina morrhuae) im mikroskopischen Bild vorherrschten, wurden in der stationären Phase kaum mehr Tetraden, sondern in erster Linie Zellhaufen sowie Einzel- und Diplococcen gefunden. Als weiterer Unterschied dieses Stammes zu den übrigen muß die vollständige Lyseresistenz der Zellen in H_2O genannt werden. Selbst wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Zellen in destilliertem Wasser führte zu keiner mikroskopisch erkennbaren Beschädigung der Zellstruktur. Bei den Stämmen CCM 889 und CCM 537 konnte dagegen eine teilweise Lyse in Wasser beobachtet werden.

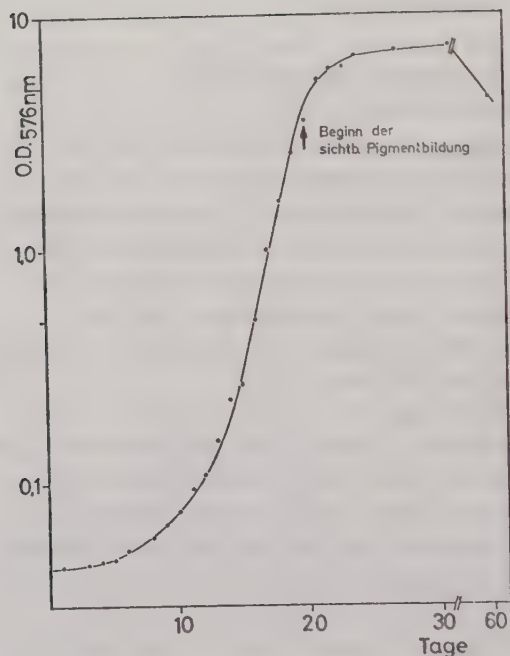


Abbildung 2:
Wachstumskurve von
Halococcus morrhuae
CCM 859 (Inkubations-
temperatur 30°C;
Animpfdichte 1 %).

1.2. Pigmente*

Ein für extrem halophile Bakterien charakteristisches Kennzeichen ist die rote bis orange Pigmentierung der Zellen. Die für diese Färbung verantwortlichen Pigmente bestehen aus Isoprenoid-Verbindungen (Kushwaha et al. 1973), deren qualitative und quantitative Zusammensetzung durch das Nährmedium beeinflusst werden kann (Gochnauer et al. 1972).

Die Pigmentbildung wurde bei den untersuchten Halococcus-Stämmen jeweils gegen Ende der logarithmischen Phase sichtbar (Abb.2); die Kulturen färbten sich dabei von orange nach ziegelrot. In Kulturen mit suboptimalen Wachstumsbedingungen (z.B. Merck-Hefeextrakt, Anzucht bei 37°C) erfolgte keine Rotfärbung.

* Die Isolierung und Analyse der Pigmente wurde von H. Reitmeier, Institut für Biochemie der Universität München, durchgeführt.

Da über die Pigmente extrem halophiler Kokken kaum Untersuchungsergebnisse vorliegen, wurden Zellen des Stammes CCM 859 auf ihre Pigmentzusammensetzung untersucht. Die dafür gewonnenen Zellen entstammten Schüttelkulturen, von denen eine im Dunkeln, die andere unter starker Belichtung gezogen worden war. Nach Zerschlagen der Zellen wurden die Pigmente mit Petroläther extrahiert und säulenchromatographisch über Al_2O_3 getrennt. Die extrahierten Pigmente fanden sich bei beiden Zellproben übereinstimmend in einer einzigen Fraktion, deren säulenchromatographisches Verhalten und Spektrum (Abb.3) die Identifizierung des Pigments als Bacterioruberin (C_{50} -Isoprenoid) zuließ. Das Fehlen weiterer Pigmente (β -Carotin, Lycopin, Retinal) schließt aus, daß von diesem Stamm unter den gewählten Anzuchtbedingungen ein Retinal-Proteinkomplex, das sogenannte Bacteriorhodopsin gebildet wurde. Dieser Komplex wurde bei Halobakterien als wichtiger Bestandteil der Purpurmbran gefunden (Oesterheldt and Stoeckenius 1971). Die Untersuchungen von Kushwaha et al. (1973) ergaben, daß von 2 zum Genus Halococcus gehörenden Stämmen in einem Fall mehrere Pigmente vorkommen (Phytoen, β -Carotin, Retinal, Bacterioruberine), während der andere Stamm ebenso wie H.morrhuae CCM 859 nur Bacterioruberine aufwies.

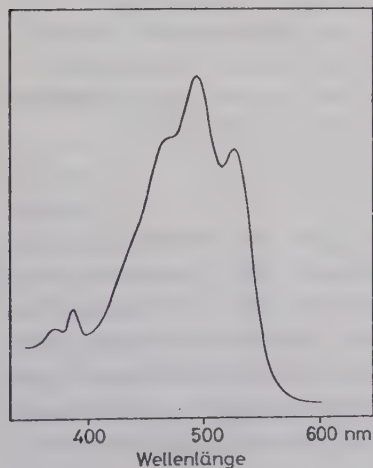


Abbildung 3:
Spektrum des aus H.morrhuae
CCM 859 isolierten Pigments
(Bacterioruberin)

1.3. Verhalten gegenüber Antibiotica

Untersucht wurde die Wachstumshemmung in Abhängigkeit von Art und Menge des im Inkubationsmedium befindlichen Antibioticums bei H.morrhuae CCM 859 und außerdem zu Vergleichszwecken bei Stämmen der Art Micrococcus luteus, E.coli und Saccharomyces cerevisiae. Die gewählten Antibiotica Chloramphenicol, Streptomycin und Actidion sind Inhibitoren der Proteinsynthese, wobei die beiden erstgenannten spezifisch die Proteinsynthese an 70s-Ribosomen (Prokaryonten), das letztere spezifisch an 80s-Ribosomen der Eukaryonten hemmt. Erwartungsgemäß wurde nur das Wachstum der Hefezellen durch Actidion gehemmt, während selbst Konzentrationen von 200 µg/ml bei den Bakterienstämmen keine Wirkung zeigten. Im Gegensatz zu den übrigen Bakterienstämmen hatten Streptomycingaben bis zu 100 µg/ml auf das Wachstum von Halococcus (und Saccharomyces) keinen Einfluß. Wie alle Prokaryonten wurden auch die Halococcus-Zellen in ihrem Wachstum durch Chloramphenicol gehemmt, wenn auch der Beginn einer wirksamen Hemmung mit 30 µg/ml mehr als 1 Größenordnung über der der übrigen Bakterienstämme lag.

2. Chemische Zusammensetzung der Zellwand von Halococcus morrhuae.

Eine Übersicht über die chemische ZW-Zusammensetzung der untersuchten Stämme geben die Tabellen 2 und 3. Eine vollständige Analyse aller im ZW-Material vorhandenen Komponenten wurde nur bei Stamm CCM 859 durchgeführt. Mit den dabei verwendeten Bestimmungsmethoden wurden 87 Gewichts% der ZW erfaßt.

2.1. Proteinanteil der Zellwand

"Rohzellwände", die nach dem Zerschlagen der Bakterienzellen als unlösliches Zentrifugations-Sediment erhalten worden waren, wiesen einen mehr oder weniger großen Anteil an Protein auf. Aufgrund der Aminosäureanalyse dieser ZW-Präparationen setzt sich der Proteinanteil vornehmlich aus den Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure, Serin, Alanin und Asparaginsäure zusammen. Die mit intakten Zellen vergleichbare Rot-Färbung dieser Roh-ZW

Tab.2: Chemische Zusammensetzung Trypsin-gereinigter Zellwände von H. morrhuae CCM 859.

Komponenten	µg/mg ZW	µMol/mg ZW
Glucose	79	0.44
Mannose	63	0.35
Galactose	49	0.27
Gesamt-Neutralzucker	191	1.06
Glucosamin	68	0.38
Galactosamin	36	0.20
Gulosaminuronsäure	21	0.11
Gesamt-Aminozucker	125	0.69 (0,72) ^a
Gesamt-Uronsäuren	142 ^b	0.67 ^b
Acetat	37	0.62
Glycin	7	0.10
Phosphat	11	0.12
Sulfat	141	1.47
Aschegehalt	200	
H ₂ O	150	
Gesamt-Lipide	21	

a = Gesamt-Aminozuckergehalt im Elson-Morgan-Test bestimmt.
b = bestimmt als Glucuronsäure

Tab.3: Chemische Zusammensetzung der Trypsin-gereinigten Zellwände der Stämme H. morrhuae CCM 537 und CCM 889.

Komponenten	µMol/mg ZW	
	Stamm CCM 537	Stamm CCM 889
Glucose	0.39	0.30
Mannose	0.21	0.30
Galactose	0.18	0.17
Gesamt-Neutralzucker	0.78	0.77
Glucosamin	0.21	0.35
Galactosamin	0.08	0.24
Gulosaminuronsäure	0.09	0.10
Gesamt-Aminozucker	0.38 (0.49) ^a	0.69 (0.73) ^a
Gesamt-Uronsäuren	0.24 ^b	0.63 ^b
Glycin	0.13	0.10
Sulfat	0.80	1.18

a, b s. Tabelle 2

deutet darauf hin, daß zumindest ein Teil des Proteins zu den Membranproteinen zu rechnen ist. Nach Behandlung der Roh-ZW mit Trypsin wurde eine unlösliche, nur noch schwach rosa gefärbte ZW erhalten, die als einzige Aminosäure Glycin in signifikanten Mengen enthielt.

Auch durch Inkubation mit anderen Proteinasen wie Pepsin, Pronase oder Proteinase K konnte dieser Glycin-Anteil nicht entfernt werden. Es scheint sich deshalb bei dieser Aminosäure um einen typischen Baustein der Halococcus-ZW zu handeln. Der enzymatisch entfernbare Proteinanteil machte etwa 2 % des ZW-Trockengewichts aus; seine Entfernung zeigte keinen Einfluß auf wichtige Eigenschaften der ZW wie z.B. Starrheit und Wasserunlöslichkeit.

2.2. Kohlenhydrat-Zusammensetzung der Halococcus-Zellwand

Etwa 60 % des ZW-Trockengewichts setzen sich aus Kohlenhydratkomponenten zusammen; die in diesem Anteil enthaltenen Zucker lassen sich der Klassen der Neutralzucker, Aminosucker und Uronsäuren zuordnen.

2.2.1. Neutralzucker

Die papier- und gaschromatographische Untersuchung von ZW-Hydrolysaten zeigte übereinstimmend das Vorhandensein der 3 Neutralzucker Glucose, Mannose und Galactose. Quantitative enzymatische Bestimmungen ergaben, daß diese Neutralzuckerfraktion jeweils den größten Anteil innerhalb der Kohlenhydratklassen stellt, aus denen die Halococcus-ZW zusammengesetzt ist. In der molaren Zusammensetzung fanden sich je nach Stamm unterschiedliche Verhältnisse der 3 Neutralzucker (Tabellen 2,3): das molare Verhältnis von Galactose : Mannose : Glucose betrug bei Stamm CCM 537 etwa 1 : 1.2 : 2.1, bei CCM 859 etwa 1 : 1.3 : 1.6 und bei CCM 889 1 : 1.8 : 1.8. Übereinstimmend bildet dabei Glucose die quantitativ größte, Galactose die kleinste Neutralzuckerkomponente; der Mannosegehalt variiert zwischen diesen beiden Extremen.

2.2.2. Uronsäuren

2.2.2.1. Identifizierung der Uronsäuren

Brown und Cho (1970) hatten in ZW-Hydrolysaten neben Neutral- und Aminosuktern eine Verbindung nachgewiesen, die sie unter Vorbehalt als Glucuronsäure identifizierten. Dieser Befund konnte bei allen von uns untersuchten Halococcus-Zellwänden bestätigt werden. Erste Hinweise, daß neben Glucuronsäure noch eine weitere Uronsäurekomponente, Galacturonsäure, im ZW-Material vorhanden ist, wurden durch die spezifisch goldgelbe Färbung eines Fleckens in Papierchromatogrammen von ZW-Hydrolysaten erhalten. Die gute Trennung der beiden Uronsäuren mit Hilfe der Dünnschicht-Elektrophorese erlaubte einen eindeutigen Nachweis von Glucuronsäure und Galacturonsäure in der ZW von Halococcus morrhuae. Dieses Ergebnis wurde für alle untersuchten Stämme anhand gaschromatographischer Analysen bestätigt.

2.2.2.2. Quantitative Untersuchungen

Die beiden sauren Kohlenhydratkomponenten der ZW sind in ihrer Quantität etwa der Gesamtmenge an Aminosuktern vergleichbar. Eine Ausnahme bildet Stamm CCM 537, der einen deutlich geringeren ZW-Uronsäuregehalt aufweist.

Die quantitative Bestimmung eines Gemisches aus Glucuronsäure und Galacturonsäure, d.h. die Bestimmung der einzelnen Uronsäurekomponenten ist nur sehr schwer möglich. Die glycosidischen Bindungen dieser Zucker sind einmal durch relativ hohe Hydrolysestabilität gekennzeichnet, andererseits sind Uronsäuren unter sauren Hydrolysebedingungen sehr labil; eine annähernd quantitative Freisetzung von Monomeren ist deshalb nur unter spezifischen Bedingungen möglich. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, daß zur quantitativen Untersuchung von Uronsäuren zwar sehr empfindliche Nachweismethoden existieren, diese Bestimmungsverfahren jedoch nur den Gesamt-Uronsäuregehalt ohne nähere Differenzierung erfassen.

Zur Bestimmung des molaren Verhältnisses von Glucuronsäure und Galacturonsäure in Zellwänden von H.morrhuae CCM 859

wurden deshalb 2 verschiedene Verfahren gewählt:

a) Die Zellwände wurden unter Bedingungen hydrolysiert, die eine weitgehende Freisetzung von Uronsäure-Monosacchariden erlauben. Ein Aliquot der aus dem Hydrolysat erhaltenen Uronsäurefraktion wurde papierelektrophoretisch bei pH 2.8 getrennt und die anhand von Referenzen differenzierbaren Zonen des Pherogramms eluiert. Die quantitative Bestimmung der Eluate wurde mit authentischen Standardlösungen durchgeführt. Das Resultat dieser Bestimmungsmethode (Tab.4) ergab für die ZW von Stamm CCM 859 ein molares Verhältnis der Galacturonsäure : Glucuronsäure von etwa 1 : 1.8.

Tab.4: Quantitative Bestimmung der Uronsäure-Eluate nach papierelektrophoretischer Trennung der Uronsäure-monosaccharide aus der ZW von Stamm CCM 859.

		µMol/2 mg ZW
Aufgetragene Menge der Uronsäurefraktion		0.80
Eluate:	Glucuronsäure-Lacton	0.19
	Glucuronsäure (freie Säure)	0.30
	Galacturonsäure	0.27
		0.76

b) Durch Reduktion der Carboxylgruppe an C-6 wurden die Uronsäuren im ZW-Polymer in die entsprechenden Neutralzucker überführt. Die Zunahme von Glucose und Galactose nach Reduktion spiegelt deshalb die qualitative und quantitative Zusammensetzung der ZW-Uronsäurefraktion wieder. Bei diesem Verfahren wurden nicht nur die erwähnten Schwierigkeiten der Hydrolyse umgangen; die enzymatische Bestimmung der Neutralzucker erlaubte auch sehr genaue quantitative Aussagen. Die Ergebnisse der Neutralzuckerbestimmung nach Hydrolyse der reduzierten ZW sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tab.5: Bestimmung der Neutralzuckerzunahme nach Carboxyl-Reduktion der ZW von Stamm CCM 859.

	$\mu\text{Mol/mg ZW}$		
	Glucose	Galactose	Mannose
ZW unbehandelt	0.32	0.16	0.28
ZW reduziert	0.47	0.23	0.29
Δ Uronsäuren	0.15	0.07	0.01

Ein molares Verhältnis von 1 : 2.2-2.4 für Galacturonsäure : Glucuronsäure wurde nicht nur bei wasserlöslichen ZW-Präparationen (s.2.4.) festgestellt, sondern konnte auch nach Reduktion nativer unlöslicher ZW gefunden werden. Aufgrund der geringen Zunahme des Mannosegehalts nach Carboxyl-Reduktion wurde die Uronsäurefraktion des ZW-Hydrolysats (s.o.) dünnschichtchromatographisch untersucht. Trotz der sehr hohen Nachweisgenauigkeit dieser Methode für Mannuronsäure ergaben sich keine Hinweise für das Vorhandensein dieses Zuckers in der Halococcus-ZW.

Ein Vergleich der Uronsäure-Reduktionsraten unter den beiden von Taylor and Conrad (1972) angegebenen Reduktionsbedingungen (a. Reduktion bei RT unter Konstanthaltung des pH bei 7.0; b. Reduktion bei 50°C ohne pH-Kontrolle) zeigte, daß das ZW-Material unter den für Mucopolysaccharide optimalen Bedingungen (b) am besten reduzierbar ist. Während jedoch bei Mucopolysacchariden Reduktionsraten von 85-94 % erzielt wurden, fiel bei der ZW auf, daß selbst nach 3maliger Reduktion nur zwischen 55-65 % des ursprünglich vorhandenen Uronsäuregehalts als Neutralzuckerzunahme (von Glucose und Galactose) gemessen werden konnten; bereits nach der ersten Reduktion waren jedoch nur noch 5 % des ursprünglichen Uronsäuregehalts nachweisbar. Die von Taylor and Conrad (1972) vorgeschlagene Behandlung der Hydrolysate Carboxyl-reduzierter Proben mit HNO_2 (vgl. 4.4.2.) brachte ebensowenig wie die Bestimmung der optimalen Monosaccharidfreisetzungsbedingungen für Glucose und Galactose

irgendwelche Hinweise auf das Vorliegen hydrolysestabiler Oligosaccharide, das die vergleichsweise niedrige Neutralzuckerzunahme nach Reduktion erklären könnte.

2.2.2.3. Vorliegen der Uronsäure-Carboxylgruppen im Zellwand-Polymer

Die Carboxylgruppen der ZW-Uronsäuren liegen in freier unsubstituierter Form vor. Estergebundene Gruppen konnten in der Halococcus-ZW nicht nachgewiesen werden; zudem zeigte das IR-Spektrum nativer ZW (Abb.4) bei 1610 cm^{-1} eine sehr starke Absorptionsbande, die den antisymmetrischen Valenzschwingungen von Carboxylationen zuzuordnen ist. Nach Säurebehandlung der ZW (0.01 n HCl, 1 h bei RT) verschwindet diese COO^- -Bande, während bei 1740 cm^{-1} das für C=O charakteristische Signal stark zunimmt und damit die Überführung der COO^- -Gruppe in die COOH-Gruppe zeigt (Morikawa et al. 1974).

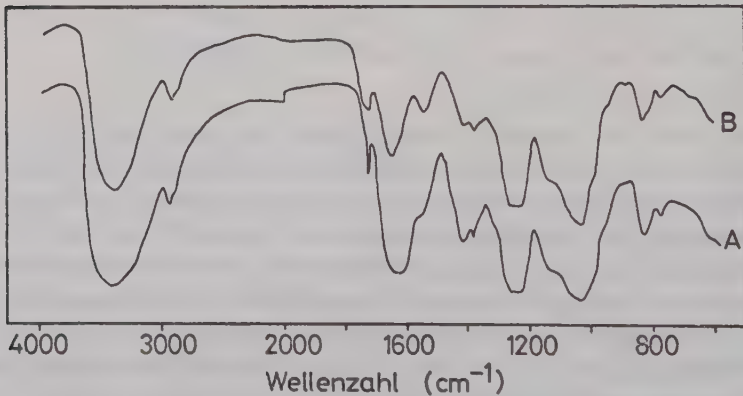


Abbildung 4:

IR-Spektren der Zellwand von H. morrhuae CCM 859. A. unbehandelte ZW; B. Säure-behandelte ZW.

2.2.3. Aminosucker

2.2.3.1. Qualitative Zusammensetzung

Die früheren Befunde von Brown and Cho (1970) und Reistad (1972) hatten gezeigt, daß Glucosamin und Galactosamin den Hauptanteil

der ninhydrin-positiven ZW-Zucker bilden. Da unter den von uns benutzten Elutionsbedingungen keine Differenzierung mit Hilfe des Aminosäureanalysators zwischen Galactosamin und Mannosamin möglich war, wurde zum Nachweis von Galactosamin die ZW nach Totalhydrolyse dem Ninhydrin-Abbau unterworfen. Nach Ninhydrin-Behandlung und anschließender zweidimensionaler Papierchromatographie konnten die Pentosen Lyxose und Arabinose anhand von Referenzchromatogrammen identifiziert werden; Lyxose kann das Abbauprodukt von Galactosamin oder Talosamin sein, Arabinose das von Glucosamin oder Mannosamin (Stoffyn 1959). Daß neben Galactosamin auch noch Mannosamin in der ZW vorliegt, konnte durch dünn-schichtchromatographische Untersuchungen von ZW-Hydrolysaten ausgeschlossen werden.

Neben Glucosamin, Galactosamin und Glycin wurde in Aminosäure-analysatorläufen von Hydrolysaten aller untersuchten Zellwände eine weitere ninhydrin-positive Komponente gefunden.

2.2.3.2. Isolierung und Charakterisierung der Gulosaminuronsäure

Erste Versuche zur Charakterisierung der unbekannten ZW-Komponente hatten gezeigt, daß ihre Hydrolysestabilität im Vergleich zu den übrigen ninhydrin-positiven ZW-Bestandteilen geringer war; durch Perjodatbehandlung eines ZW-Hydrolysats konnte die unbekannte Verbindung ebenso wie die Aminosucker zerstört werden.

Zur genaueren Charakterisierung wurde diese Komponente aus ZW-Hydrolysaten isoliert. Dabei erwiesen sich folgende Isolierungsschritte als vorteilhaft:

1. Papierchromatographie des ZW-Hydrolysats in Laufmittel F für 60 h. Als Referenzen wurden Glucosamin und Glycin cochromatographiert. Die unterhalb von Glycin gelegene ninhydrin- und $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ -positive Zone wurde mit 0.01 n HCl eluiert.
2. Papierelektrophorese des Eluates in Puffergemisch I (2,5 h). Die mit beiden Nachweisreagentien anfärbbare Zone mit einer etwas kürzeren Wanderungsweite als Glucosamin wurde eluiert.

Chromatographie und Elektrophorese des Eluates in verschiedenen Laufmittel- bzw. Puffersystemen bestätigten die Reinheit der isolierten Substanz (Tab.6).

Die Nachweisbarkeit der unbekannten Verbindung mit Ninhydrin und $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$, sowie ihre Perjodatlabilität gaben erste Hinweise darauf, daß es sich um einen Zucker mit Aminofunktion handelt. Im elektrophoretischen Verhalten bei pH 5.3 zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den bekannten Aminozuckern und der isolierten Probe (Tab.6); hier verhielt sich diese ZW-Komponente ähnlich wie Glycin, einer Verbindung also, die sowohl eine Amino- wie auch eine Carboxylfunktion besitzt.

Tab.6: Vergleich des chromatographischen und elektrophoretischen Verhaltens der isolierten Aminouronsäure mit Mannosaminuronsäure und Glycin (Glucosamin = 1.00).

	Isolierte Aminouron- säure	Mannosa- minuron- säure	Glycin
Relative Mobilität in Laufmittel F	0.39	0.34	0.53
Relative Mobilität in Puffer I	0.84	0.89	1.47
Relative Mobilität in Puffer III	0.21	0	0.18
Relative Elutionszeit auf Aminosäureanalysator	0.95	0.63	0.61

0 = nicht bestimmt

Im Elson-Morgan-Test reagierte die Probe positiv mit einem Absorptionsverhältnis von $E_{540 \text{ nm}}/E_{510 \text{ nm}} = 1.35$; damit wurde gezeigt, daß neben der reduzierenden C-1-Hydroxylgruppe auch C-3-OH der unbekannten Substanz unsubstituiert vorliegt (Cifonelli and Dorfman 1960). Nach N-Acetylierung reagierte die Probe auch im Morgan-Elson-Test positiv : ein Beweis für freie Hydroxylfunktionen an C-1 und C-4 dieses Zuckers (Mayer et al. 1974).

Die typische Anfärbung der Substanz nach Besprühen von Chromatogrammen mit Ninhydrin lieferte weitere Informationen über die Natur dieser Zuckerkomponente: bei anschließender Entwicklung bei 100°C färbte sich der Fleck zuerst gelbbraun

und nahm erst allmählich die typische Violett-Färbung an. Diese Farbreaktion ist für Hexosamin-Uronsäuren charakteristisch (Perkins 1963).

In Tabelle 6 sind die chromatographischen und elektrophoretischen Eigenschaften der isolierten Aminouronsäure zusammengestellt; die unter gleichen Bedingungen aus den Teichuronsäure-Extrakten von Micrococcus luteus isolierte Mannosaminuronsäure (Hydrolysebedingung : 1 n HCl, 90 min bei 100°C; Biely and Jeanloz 1969) und Glycin dienten als Vergleich.

Ein Vergleich der Elutionszeitverhältnisse (Glucosamin = 1.00) anderer bekannter Aminouronsäuren (Glucosaminuronsäure, Galactosaminuronsäure) im Aminosäureanalysator (H. Mayer, pers.Mitteilung) mit den Werten für die isolierte Hexosaminuronsäure deutete auf einen neuen Zucker dieser Verbindungsklasse hin.

Während dieser Untersuchungen wurde von Reistad (1974) Gulosaminuronsäure, das C-3-Epimer der Galactosaminuronsäure als ZW-Baustein eines extrem halophilen Kokkus identifiziert. Bei weiteren Untersuchungen an einer Reihe von Halococcus-Stämmen (Reistad 1975) konnte diese Aminouronsäure auch bei H.morrhuae CCM 889 nachgewiesen werden. Da die von uns aus Stamm CCM 859 isolierte Hexosaminuronsäure in ihrem chromatographischen Verhalten mit der von Stamm CCM 889 übereinstimmt, kann es als gesichert gelten, daß Gulosaminuronsäure auch der in der ZW von H.morrhuae CCM 859 (und CCM 537, da ebenfalls identische chromatographische Eigenschaften vorlagen) vorkommende Hexosaminuronsäure-Baustein ist.

2.2.3.3. Quantitative Untersuchungen

Wie erwähnt, liegt der Gesamt-Aminozuckergehalt der Zellwände mit Ausnahme des Stammes CCM 537 in der Größenordnung der ZW-Uronsäuren. Glucosamin stellt dabei den Hauptanteil, während Gulosaminuronsäure in der Regel die kleinste Komponente bildet.

Voraussetzung zur quantitativen Bestimmung der Gulosaminuronsäure in ZW-Hydrolysaten mit Hilfe des Aminosäureanalysators war die Ermittlung des molaren Absorptionskoeffizienten (Analysator-Konstante) dieser Verbindung. Da keine authentische Substanz zur Verfügung stand, wurde die Konstante indirekt bestimmt. In einer Lösung der isolierten Gulosaminuronsäure wurde die Konzentration dieses Zuckers mit verschiedenen Methoden bestimmt: Elson-Morgan-Test, Anhydrozucker-Test und der Test auf reduzierende Gruppen mit jeweils Glucosamin als Standard brachten übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der (Amino-) Zuckerkonzentration in dieser Lösung. Dieselbe Konzentration wurde mit Hilfe des Morgan-Elson-Tests (Standard: N-Acetylglucosamin) ermittelt, nachdem ein Aliquot der Probe vorher N-acetyliert worden war. Nach Bestimmung der Peakfläche eines am Analysator untersuchten Aliquots der Lösung, konnte daraus die Konstante der Gulosaminuronsäure bestimmt werden. Es zeigte sich, daß der molare Extinktionskoeffizient der Aminosäure ebenso wie der anderer Aminozucker bei einem Wert von etwa 40 liegt.

Trotz der Zwitterstellung der Hexosaminuronsäuren zwischen Aminozuckern und Uronsäuren ordneten wir die Gulosaminuronsäure den ZW-Aminozuckern zu, da sie (ebenso wie die isolierte Mannosaminuronsäure) die für Aminohexosen typischen chemischen Nachweisreaktionen zeigte, während eine Uronsäurebestimmung mit den üblichen Methoden nicht möglich war.

2.2.3.4. Aminogruppensubstitution der Hexosamine

Der Vergleich dinitrophenylierter Zellwände und unbehandeltem ZW-Material des Stammes CCM 859 mit Hilfe des Aminosäureanalysators erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden ZW-Präparationen. Der Glycingehalt der ZW nahm nach Dinitrophenylierung um etwa 25 % ab. Ebenso wenig erbrachte die dünnschichtchromatographische Analyse von DNP-ZW-Hydrolysaten einen Hinweis auf dinitrophenylierte Aminozucker; DNP-Glycin konnte jedoch nachgewiesen werden.

Nach Behandlung der ZW mit salpetriger Säure für 80 min (Lagunoff and Warren 1962) wurden keine Anhydrohexosen im Test gefunden: dies spricht gegen freie oder durch Sulfat N-substituierte Aminogruppen.

Gute Hinweise für eine Säureamid-artige Substitution der Amino-
gruppen ergaben sich bereits aus dem IR-Spektrum säurebehandelter
ZW (Abb.4). Durch die Überführung des Uronsäure-Carboxylations
in die undissoziierte COOH-Gruppe verschwindet die starke Ab-
sorptionsbande bei 1610 cm^{-1} , so daß 2 Signale bei 1550 und
 1640 cm^{-1} sehr gut erkennbar werden. Diese beiden Signale sind
den Amid I- und Amid II-Banden zuzuordnen (Mirelman et al.1973)
und sprechen für N-Acylsubstituenten der ZW-Aminozucker.
Die quantitative Bestimmung von Acetat in Zellwänden des Stammes
CCM 859 zeigte, daß Aminozucker und Acetat in etwa gleichen
molaren Mengen vorliegen; andererseits konnten keine esterger-
bundenen Gruppen in der ZW nachgewiesen werden. Die Freisetzungs-
kinetik der Aminogruppen im ZW-Polymer (gemessen als Anhydro-
zucker-Zunahme) bei Hydrolyse mit 2 n TFA entsprach den bei
N-Acetyl-Heparin gefundenen (Höök et al. 1974) Verhältnissen.
Diese Ergebnisse erlauben den Schluß, daß die Aminozucker der
ZW als N-Acetylhexosamine vorliegen. Im Falle des Glucosamins
konnte das N-acetylierte Derivat direkt aus der Neutralzucker-
fraktion von ZW-Hydrolysaten (mit Oxalsäure) papierchromato-
graphisch nachgewiesen werden.

2.2.3.5. Vorliegen der Gulosaminuronsäure-Carboxylgruppen im ZW-Polymer

Nach Behandlung der ZW unter den für die Reduktion der Uron-
säure-Carboxylgruppen üblichen Bedingungen und anschließender
Hydrolyse konnte die Gulosaminuronsäure auf dem Aminosäure-
analysator nicht mehr nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß die
Carboxylgruppe der Hexosaminuronsäure ebenso wie die der ZW-
Uronsäuren in freier unsubstituierter Form vorliegt.

2.3. Anorganische Bestandteile der Zellwand

Der Aschegehalt von etwa 23 % des ZW-Trockengewichts ist außer-
gewöhnlich hoch. Auch Brown and Cho (1970) hatten bei den ersten
Untersuchungen an der ZW eines extrem halophilen Kokkus auf den
ungewöhnlich hohen Aschegehalt hingewiesen; sie fanden jedoch,
daß der überwiegende Teil davon auf Chlorid (aufgrund ihrer
ZW-Präparationsmethode) zurückzuführen war. In den von uns

isolierten Zellwänden konnten keine signifikanten Mengen an Chlorid nachgewiesen werden - ein Hinweis dafür, daß in den ZW-Präparationen keine Kontamination mit anorganischen Bestandteilen des Nährmediums anzunehmen war.

2.3.1. Sulfat

Die Analyse der ZW-Asche zeigte, daß 57 % (w/w) aus anorganischem Sulfat bestanden. Damit bildet Sulfat den bei weitem höchsten Anteil der in der ZW vorliegenden Anionen.

Überraschend war bei der Analyse der Kationen-Zusammensetzung, daß die gefundenen Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) bei Berechnung der Ladungsbilanz ($\text{mVal} \times \% = \text{Gewichts\%} \times \text{Ionenwertigkeit} \times 1000 / \text{Molekulargewicht}$) nur zu etwa 50 % die negative Ladung der Anionen kompensieren konnten. Nachdem eine Kontamination der ZW mit Bestandteilen des Nährmediums zumindest sehr unwahrscheinlich war, wurden der hohe Sulfatgehalt sowie die Unausgeglichenheit der Ladungsbilanz als Hinweise auf eine chemische Bindung von Sulfat an Komponenten der ZW gewertet.

2.3.2. Phosphat

In den Zellwänden von H.morrhuae CCM 859 wurde Phosphat in der Größenordnung von etwa 1 % (w/w) gefunden. Obwohl in den durch Trypsinverdauung gereinigten ZW-Präparationen in geringem Maße Lipide nachgewiesen werden konnten (Tab.2), zeigte der nur geringfügig (etwa 10 %) verminderte Phosphatgehalt lipid-extrahierter Zellwände, daß die Herkunft des Phosphats nicht durch Rest-Membranbestandteile erklärt werden konnte. Brown and Cho (1970) fanden in ihren ZW-Präparationen Nucleinsäure-Kontaminationen in der Größenordnung von 1.0-1.3 %. Diese Erklärungsmöglichkeit schied im Falle der von uns untersuchten Zellwände aus: auch nach DNase- und RNase-Behandlung wurde der überwiegende Teil des Phosphats im unlöslichen ZW-Polymer gefunden.

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse eines Markierungsexperiments mit Zellwänden des Stammes CCM 859. Eine Schüttelkultur (300 ml) dieses Stammes wurde nach Inkubation mit radioaktiv

markiertem Phosphat ($500 \mu\text{Curie } ^{32}\text{PO}_4^{3-}$) geerntet und die Zellwände isoliert. Die Aktivitäten der bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten der ZW erhaltenen Fraktionen wurden auf die der Ausgangs-ZW-Präparation (Roh-ZW) extrapoliert.

Tab.7: Abnahme der $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ -Markierung von Zellwänden des Stammes CCM 859 mit fortschreitender Reinigung.

ZW-Behandlung	Gesamtaktivität (CpM/Fraktion)	% der Aktivität bezogen auf Roh-ZW
1. Roh-ZW	798 000	100
2. ZW-Trypsin-behandelt	696 000	87
3. ZW-lipidextrahiert	617 000	77
4. ZW-DNase und RNase-behandelt	502 000	63
5. ZW behandelt mit alkalischer Phosphatase	456 000	57

Die genannten Ergebnisse sprechen dafür, daß der größere Teil des in den Zellwänden gefundenen Phosphats nicht von Kontaminationen durch andere Zellbestandteile herrührt, sondern einen weiteren anorganischen Baustein der ZW darstellt.

2.4. Chemische Zusammensetzung der wasserlöslichen Zellwandpräparation von H.morrhuae CCM 859.

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit war in vielen Fällen eine ZW-Präparation erforderlich, die neben ihrer Löslichkeit in Wasser möglichst weitgehend der nativen ZW in ihrer chemischen Zusammensetzung entsprechen sollte. Durch Inkubation Trypsin-gereinigter Zellwände in 0.5 n NaOH in Gegenwart von NaBH_4 bei 60°C für 12 h konnte eine solche ZW-Präparation erhalten werden. Durch die Zugabe von Borhydrid werden die primär vorliegenden, sowie die bei der Alkalibehandlung entstehenden reduzierenden Enden des Polysaccharids vor weiterem Abbau ("peeling") geschützt (Rees 1961).

Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, bestehen zwischen nativer und wasserlöslicher ZW keine grundlegenden Unterschiede. Mit Aus-

nahme von Glucose und Glucosamin, die jeweils um etwa 20 % durch die Alkalibehandlung abnahmen, blieben die übrigen Kohlenhydratkomponenten sowie der Sulfatgehalt der ZW praktisch unverändert; allein Glycin zeigte eine starke Abnahme.

Tab.8: Vergleich der chemischen Zusammensetzung von wasserlöslicher und nativer Zellwand des Stammes CCM 859.

Komponenten	µMol/mg ZW	
	wasserlös1.ZW	native ZW
Glucose	0.35	0.44
Mannose	0.35	0.35
Galactose	0,25	0.27
Glucosamin	0.29	0.38
Galactosamin	0.20	0.20
Gulosaminuronsäure	0.09	0.11
Gesamt-Uronsäuren	0.66	0.67
Glycin	0.05	0.10
Sulfat	1.35	1.47

Die gefriergetrocknete wasserlösliche ZW war im schwach Sauren sehr gut, im Alkalischen nur schlecht löslich. Konzentriertere Lösungen (100 mg/ml) zeigten eine hohe Viskosität und bildeten auf Glasplatten (Objektträger) nach dem Trocknen einen spröden, leicht zerbrechlichen Film, der sich nur schwer von der Platte entfernen ließ: dieses Verhalten des ZW-Films ist für verzweigte-kettige Polysaccharide charakteristisch (Danishefsky et al.1970).

3. Zur strukturechemischen Klassifizierung der Halococcus-Zellwand

Mit den folgenden Experimenten wurde an Zellwänden von H.morrhuae CCM 859 die Frage untersucht, welcher Kategorie von Strukturpolysacchariden die ZW der extrem halophilen Kokken zuzuordnen ist: Ist die ZW aus mehreren verschiedenen Strukturkomplexen, die ihrerseits Homo- oder Heteroglycane sein können, zusammengesetzt oder entspricht die ZW-Struktur der eines aus verschiedenen Zuckerbausteinen zusammengesetzten Heteropolysaccharids ?

Gleichzeitig wurde die Bedeutung des hohen Sulfatanteils für den Aufbau der Halococcus-ZW untersucht.

3.1. Versuche zur spezifischen Extraktion von Polymeren aus dem Zellwandmaterial

3.1.1. Extraktionsmethoden mit Alkali

Durch Inkubation mit 4 % NaOH bei RT können aus pflanzlichen Zellwänden neutrale Homo- oder Heteroglycane (Hemicellulosen) extrahiert werden (Bleiss et al. 1973). Eine Behandlung der ZW unter diesen oder ähnlichen Bedingungen (0.1 n, 0.25 n, 0.5 n, 1.0 n NaOH) ergab in keinem der untersuchten Fälle eine Extraktion von polymerem Material. Die behandelten Zellwände zeigten keine qualitativen Unterschiede zu unbehandeltem Material.

Die zur Extraktion von Mannan angewandte Alkalibehandlung führte zu einer weitgehenden Solubilisierung der ZW. Aus dem Extraktionsüberstand der zu Vergleichszwecken mituntersuchten ZW von Saccharomyces cerevisiae konnte sehr spezifisch nach Zugabe von Fehlingscher Lösung ein ausschließlich aus Mannose aufgebautes Polymer ausgefällt werden; im Falle der Halococcus-ZW führte dieses Verfahren zu keiner Fällung.

Die negative Reaktion der ZW auf die Zugabe von Jod-Jodkali schloß weiterhin die Präsenz Amylose-ähnlicher Strukturen in diesem Polysaccharid aus.

3.1.2. Extraktionen durch Säurebehandlung

3.1.2.1. Trichloressigsäure(TES)-Extraktion

Die Behandlung der ZW mit TES unter Bedingungen, die bei Zellwänden grampositiver Bakterien die Extraktion der Teichonsäuren ermöglichen, führte zur Isolierung von 2 polymeren ZW-Fractionen; dem unlöslichen ZW-Rückstand und löslichem polymerem Material, das durch Äthanol-fällung aus dem Extraktionsüberstand gewonnen werden konnte. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Untersuchung beider Polymere zusammengefaßt. Weniger als 10 % der ZW-Zucker-komponenten konnten als extrahierbares polymeres Material gewonnen werden. Diese Fraktion unterscheidet sich jedoch deutlich in ihrer molaren Zusammensetzung vom unlöslichen Extraktions-

rückstand. Gulosaminuronsäure und Glucose sind im extrahierten Material in auffällig geringer Konzentration vertreten, während Galactosamin und Mannose neben den Uronsäuren Hauptkomponenten sind. Bemerkenswert im Vergleich zu nativer ZW ist weiterhin, daß der unlösliche Rückstand der Extraktion ein molares Verhältnis von Galactosamin : Gulosaminuronsäure von etwa 1 : 1 aufweist.

Tab.9: Zusammensetzung des extrahierten polymeren Materials und des unlöslichen Rückstands nach TES-Extraktion von Zellwänden des Stammes CCM 859.

	unlöslicher Rückstand [μ Mol/mg extrah. ZW]	extrahiertes Polymer [μ Mol/10 mg ZW]
Glucose	0.51	0.08
Mannose	0.31	0.16
Galactose	0.28	0.10
Gesamt-Neutralsucker	1.10	0.34
Glucosamin	0.36	0.18
Galactosamin	0.16	0.31
Gulosaminuronsäure	0.14	0.02
Gesamt-Aminozucker	0.66	0.40
Gesamt-Uronsäuren	0.67	0.45
Glycin	0.12	0.07

3.1.2.2. Extraktion mit Glycin/HCl-Puffer pH 3.0.

Bei Zellwänden grampositiver Bakterien dient dieses Verfahren zur selektiven Extraktion von Teichuronsäuren (Pavlik and Rogers 1973). Das auf diese Weise aus Halococcus-Zellwänden extrahierte polymere Material wies ebenso wie die entsprechende Fraktion der TES-Extraktion nur geringe Mengen der Aminouronsäure jedoch einen hohen Anteil an Galactosamin, Uronsäuren und Mannose auf.

3.1.2.3. Extraktion von Pektinsubstanzen

Unter den Bedingungen, die zur Extraktion von Pektinsubstanzen, d.h. Uronsäure-haltigen löslichen ZW-Polysacchariden der Pflanzen-ZW führen, konnte aus den Zellwänden von Halococcus kein

polymeres Material extrahiert werden. Die Untersuchung von unlöslichem Rückstand und dem Extraktionsüberstand zeigte, daß zumindest qualitativ übereinstimmend in beiden Fraktionen alle ZW-Komponenten vertreten sind.

3.1.2.4. Behandlung der Zellwände mit Fluorwasserstoff

Durch Inkubation von Phosphatester-haltigem Material mit 60 % HF in der Kälte ist es möglich, unter weitgehender Schonung glycosidischer Bindungen (Reske 1973) relativ spezifisch die Phosphatgruppen abzuspalten (F.Fiedler, pers.Mitteilung). Im Falle von Phosphodiesterbindungen sollte daher eine spezifische Spaltung des Polymers möglich sein.

Die Untersuchungsergebnisse der auf diese Weise erhaltenen polymeren ZW-Fractionen sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tab.10: Zusammensetzung der unlöslichen bzw. löslichen polymeren Fraktion nach Behandlung der ZW mit HF.

	$\mu\text{Mol/mg}$ behandelter ZW	
	unlös1.ZW-Rückst.	lösliches Polymer
Glucose	0.27	0.037
Mannose	0.18	0.061
Galactose	0.11	0.016
Gesamt-Neutralzucker	0.56	0.114
Glucosamin	0.16	0.019
Galactosamin	0.09	0.091
Gulosaminuronsäure	0.08	Spuren
Gesamt-Aminozucker	0.33	0.110
Gesamt-Uronsäuren	0.36	0.079
Glycin	0.08	Spuren

Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Extraktionsverfahren wurde auch durch HF-Behandlung nur ein geringer polymerer Anteil aus der ZW gelöst. Wie entsprechende Versuche an $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ -markierten Zellwänden zeigten, wurden nach HF-Behandlung im Ungelösten jedoch weniger als 10 % der Gesamtaktivität der (unbehandelten) ZW gefunden. Dies spricht für eine relativ hohe Spaltungsspezifität dieser Methode.

Für die Aminosucker des unlöslichen ZW-Polymers ist wiederum die molare Zusammensetzung von Glucosamin : Galactosamin : Gulosaminuronsäure von etwa 2 : 1 : 1 charakteristisch. Auch die Zusammensetzung der löslichen Fraktion ist denen anderer Extrakte ähnlich.

3.2. Versuche zur enzymatischen Spaltung der Zellwand mit Hilfe von Exo- und Endoglycosidasen

Die Inkubation löslicher ZW-Präparationen mit Exoglycosidasen verschiedener Spezifität (β -Amylase; α -1.4- α -1.6-Amyloglucosidase; Dextranase; α -, β -Galactosidase; α -, β -Glucosidase; N-Acetyl- β -Glucosaminidase; β -Glucuronidase; α -Mannosidase) sowie Endoglycosidasen (α -Amylase, Hyaluronidase, Pectinase) brachte keine Hinweise auf Freisetzung von Mono- bzw. Oligosacchariden. Auch nach Behandlung mit einem Glycosidasengemisch bzw. gleichzeitiger Inkubation mit mehreren Exoglycosidasen (α -, β -Glucosidase; α -, β -Galactosidase; α -Mannosidase) konnte keine Zunahme an reduzierenden Zuckern bzw. Glucose, Galactose oder Mannose festgestellt werden.

3.3. Versuche zur chromatographischen Fraktionierung der Halococcus-Zellwand

3.3.1. Gelfiltration von wasserlöslicher Zellwand

Nach Gelfiltration von wasserlöslicher ZW über Sephadex G-200 wurde das ZW-Polymer als einheitliche Fraktion erhalten, die mit dem Ausschlußvolumen oder nur schwach verzögert eluiert wurde. Es kann deshalb angenommen werden, daß diese ZW-Präparation aus polymerem Material mit einem Molekulargewicht von über 200 000 (bei Annahme einer Dextran-ähnlichen linearen Struktur) besteht.

3.3.2. Fraktionierung löslicher Zellwand mit Hilfe von Ecteola-Cellulose.

Eine wasserlösliche ZW-Präparation wurde von einer Säule mit dem schwach basischen Anionenaustauscher Ecteola-Cellulose durch einen NaCl-Stufengradienten eluiert. Dabei zeigte sich, daß mehr als 90 % des ZW-Materials an den Ionenaustauscher gebunden wurde. Erst bei Ionenkonzentrationen von 0.5 M und höher erfolgte

die Elution der ZW-Kohlenhydrate. Die weitere Untersuchung der erhaltenen Fraktionen machte deutlich, daß keine Trennung in verschiedenartige Polymere erreicht worden war: in jeder Fraktion waren Neutralzucker, Uronsäuren und Aminosucker in ungefähr denselben quantitativen Verhältnissen vorhanden.

3.4. Fraktionierung der Zellwand mit Hilfe quaternärer Ammonium-Salze

Kationische Detergentien wie Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bilden mit Polyanionen Salze, die in Wasser unlöslich sind. In Abhängigkeit von der Ladung und dem Molekulargewicht d.h. der Ladungsdichte des anionischen Polymers ist es möglich, durch Variation der Konzentration eines anorganischen Elektrolyten (Salzes) den entstandenen CTAB-Polyanion-Komplex wieder aufzulösen (Scott 1965).

Nach Zugabe von Cetavlon (CTAB) zu einer Lösung der Halococcus-ZW wurde ein voluminöser Niederschlag erhalten, der erst in 1.5 m KCl wieder vollständig in Lösung ging. In Tabelle 11 sind qualitative und quantitative Zusammensetzung der mit zunehmender Ionenstärke aus dem ZW-CTAB-Komplex gelösten Fraktionen zusammengestellt.

Tab.11: Fraktionierung der löslichen Zellwand durch stufenweise Auflösung des CTAB-ZW-Komplexes mit steigenden KCl-Konzentrationen.

	Mol% der ZW-Komponenten nach Lösung in KCl			
	0 m	0.4 m	0.9 m	1.5 m
Glucose	7.0	6.0	86	1.0
Mannose	1.4	4.1	86	8.5
Galactose	1.0	4.5	90.5	4.0
Gesamt-Neutralzucker	3.6	4.9	87	4.3
Glucosamin ^a	(+)	(+)	> 95	(+)
Galactosamin ^a	(-)	(-)	> 98	(+)
Gulosaminuronsäure ^a	(-)	(+)	> 95	(-)
Gesamt-Aminosucker ^b	1.7	3.4	90.2	4.7
Gesamt-Uronsäuren	0.8	2.9	93.8	2.4
Sulfat	3.7	5.9	88	2.5
Glycin ^a	(+)	(+)	> 95	(-)

a = Infolge der geringen Mengen konnte nur in der Hauptfraktion eine quantitative Auswertung mit Hilfe des Aminosäureanalysators erfolgen. (+) = Peak im Analysatorlauf erkennbar, (-) = kein Peak erkennbar

b = Gesamt-Aminosuckergehalt durch Elson-Morgan-Test ermittelt.

Das Ergebnis dieses Fraktionierungsversuchs ist in folgenden Punkten bemerkenswert: i) Etwa 90 % sämtlicher in der ZW von Halococcus enthaltenen Kohlenhydrat-Komponenten wurden in einer einzigen Fraktion gefunden; ii) Durch die Inkubation der ZW mit Cetavlon erfolgte keine Trennung des ZW-Polysaccharids in in ihrer elektrischen Ladung unterschiedliche Polymere: die mit Cetavlon nicht fällbaren ZW-Bestandteile liegen weit unter 10 % der Gesamtmenge; sie weichen in ihrer qualitativen Zusammensetzung praktisch nicht von nativer ZW ab, so daß sich keine Hinweise auf das Vorliegen neutraler oder kationischer Polymere ergeben. iii) Die kritische Salzkonzentration der ZW, d.h. die zur Lösung des CTAB-Polysaccharid-Komplexes erforderliche Salzkonzentration liegt im Konzentrationsbereich für KCl von >0.4 m und ≤ 0.9 m.

Versuche zur genaueren Bestimmung der kritischen Salzkonzentration des ZW-CTAB-Komplexes zeigten, daß bei stufenweise zunehmender Salzkonzentration (in Schritten von jeweils 0.1 m KCl) erst bei 0.8 m KCl eine vollständige Lösung erzielt werden konnte. Entsprechende Versuche an anderen negativ geladenen Polymeren ergaben für Chondroitinsulfat 0.8 m KCl und für Heparin 0.9 - 1.0 m KCl als kritische Konzentration.

3.5. Bedeutung und Charakterisierung des Sulfatanteils im Halococcus-ZW-Polymer

Durch die Fraktionierungsversuche konnte die ZW als anionisches Polymer charakterisiert werden. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, inwieweit diese Eigenschaft der ZW mit dem hohen Sulfatgehalt in Zusammenhang steht.

3.5.1. Komplexierung der Zellwand mit Cetavlon bei pH 1.8

Ebenso wie im Neutralen konnten über 90 % aller ZW-Bausteine in dem ZW-CTAB-Komplex nachgewiesen werden, der nach Zugabe von Cetavlon zu einer ZW-Lösung in Puffer I pH 1.8 ausgefällt werden konnte. Bei diesem pH liegen die Carboxylgruppen der Uronsäuren undissoziiert vor und spielen daher für den sauren Charakter der ZW keine Rolle.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die negative Ladung der Halococcus-ZW nicht allein durch ihre Uronsäuren, sondern primär durch stark saure Gruppen bedingt ist, die selbst bei niedrigem pH noch ionisiert vorliegen. Sulfat bildet die einzige, in beträchtlichen Mengen vorliegende stark saure ZW-Komponente, so daß die weiteren Untersuchungen klären sollten, in welcher Weise Sulfat in der ZW gebunden ist.

3.5.2. Die Bindung der Sulfatgruppen im Zellwand-Polymer

3.5.2.1. Alkalistabilität der Sulfatbindung

Bereits der Vergleich von nativer und alkalibehandelter löslicher ZW zeigte (Tab.8), daß unter den Bedingungen der ZW-Solubilisierung kein Sulfatverlust auftrat. Auch nach Behandlung von ZW mit 1 n NaOH und NaBH_4 (10 mg/ml) für 2 h bei 80°C konnte keine Zunahme von freiem anorganischen Sulfat gegenüber unbehandelten Vergleichsproben festgestellt werden; mit Hilfe dieser Methode läßt sich bei vielen sulfathaltigen Algenpolysacchariden eine zumindest teilweise Desulfatisierung erzielen (Rees 1961). Entsprechende an Carboxyl-reduzierter ZW durchgeführte Versuche zeigten ebenfalls die Alkalistabilität der ZW-Sulfatgruppen.

3.5.2.2. Säurelabilität der Sulfatbindung

Erste Versuche zur Abspaltung des Sulfats hatten gezeigt, daß nach einer Behandlung der ZW mit 0.04 n HCl für 90 min bei 100°C etwa 50 % des ursprünglich in der ZW gebundenen Sulfats als anorganisches Sulfat freigesetzt wurden. Der unter diesen relativ milden Hydrolysebedingungen abgespaltene Sulfatanteil entspricht meist (Cifonelli and Dorfman 1960) Sulfatgruppen, die säureamidartig an Amino hexosen gebunden sind. Die Untersuchungsergebnisse zur Substitution der ZW-Aminozucker (s.2.3.3.4.) sprechen jedoch eindeutig gegen das Vorliegen von Sulfoaminogruppen.

3.5.2.3. Hydrolysekinetik des Zellwand-Sulfatanteils

Die Hydrolyseraten des Sulfatanteils in Polysacchariden ergeben unter standardisierten Bedingungen wichtige Hinweise zur Charak-

terisierung der Bindungspositionen, die für eine esterartige Bindung des Sulfats an Zuckerkomponenten in Frage kommen (Rees 1963). Aufgrund der Halbwertszeit, d.h. der zur Hydrolyse von 50 % esterartig gebundener Sulfatgruppen benötigten Zeit (bei Hydrolyse in 0.25 n HCl und 100°C), lassen sich Sulfatesterbindungen differenzieren in: i) Bindung an äquatoriale sekundäre Hydroxylgruppen ($t_{1/2} = \leq 0.4$ h); ii) axiale sekundäre OH-Gruppen ($t_{1/2} = 0.4 - 1.5$ h); iii) äquatoriale primäre OH-Gruppen ($t_{1/2} = 1.5 - 2.4$ h).

In Abbildung 5 ist die Freisetzungskinetik der ZW-Sulfatgruppen gezeigt. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ läßt sich graphisch aus der erhaltenen Gerade für $\log(a/a-x) = 0.3$ ermitteln, wobei x die zur jeweiligen Probenentnahmezeit bestimmte Menge an anorganischem Sulfat, a die Gesamtmenge des Sulfats angibt.

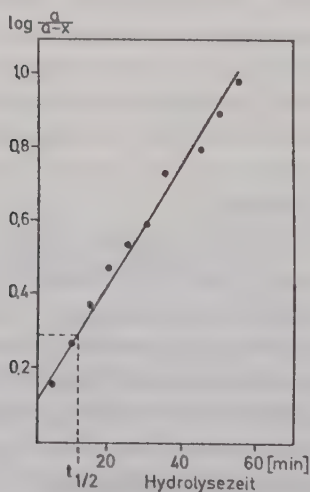


Abbildung 5:
Ermittlung der Hydrolysen-
Halbwertszeit der ZW-
Sulfatgruppen.

Die graphische Darstellung der Kinetik ergab eine Gerade. Die daraus ermittelte Halbwertszeit von etwa 0.25 h spricht für das Vorliegen von Sulfatestern in der Halococcus-ZW, die an sekundären Hydroxylgruppen mit äquatorialer Position gebunden sind. Aufgrund der Linearität der Hydrolysekinetik scheinen nur derartige Hydroxylgruppen an der Sulfatbindung beteiligt zu sein.

3.5.2.4. Nachweis esterartig gebundener Sulfatgruppen durch IR-Spektroskopie

Der direkte Nachweis für die esterartige Bindung des Sulfatanteils an Hydroxylgruppen des ZW-Polysaccharids konnte mit Hilfe der IR-Spektroskopie erbracht werden. In Abbildung 6 sind die IR-Spektren der Halococcus-ZW und Chondroitinsulfat verglichen: beide Spektren zeigten eine bemerkenswerte Ähnlichkeit. In beiden Polysacchariden ist eine starke Absorptionsbande bei 1240 cm^{-1} , die für S=O in Sulfatestern charakteristisch ist (Lloyd et al. 1961), erkennbar.

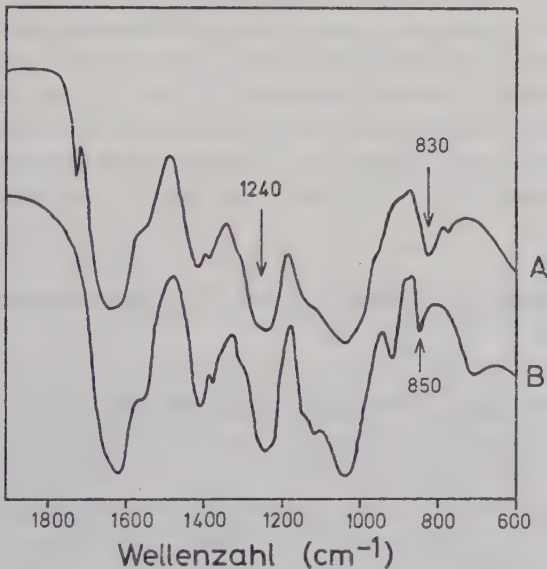


Abbildung 6:

IR-Spektren der Halococcus-Zellwand (A) und von Chondroitinsulfat (B)

Nähere Aussagen über die Position des estergebundenen Sulfats ermöglichten die Absorptionssignale im sogenannten "fingerprint"-Bereich des IR-Spektrums ($700\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$). Chondroitinsulfat weist mit einem Absorptionsmaximum bei 850 cm^{-1} ein für Chondroitin-4-Sulfat und damit für Sulfatester in sekundärer axialer Position typisches Signal auf (Wessler 1971). Demgegenüber wurde im

Spektrum der Halococcus-ZW eine Absorptionsbande bei 830 cm^{-1} gefunden; die Absorption bei dieser Wellenzahl ist charakteristisch für Sulfatester, die an sekundäre Hydroxylgruppen in äquatorialer Position gebunden sind (Roy and Trudinger 1970).

4. Die Analyse von Zellwandfragmenten: Aussagen zur Struktur des Zellwandpolymers und zur Position der estergebundenen Sulfatgruppen

Das Hauptziel der vorliegenden Untersuchungen war, festzustellen, welche der ZW-Komponenten durch estergebundene Sulfatgruppen substituiert sind und inwieweit damit Ähnlichkeiten zu den Sulfat-Substitutionsmustern anderer sulfatisierter Polysaccharide vorliegen. Durch Zerlegung des ZW-Polymers in kleinere Bruchstücke unter möglichst weitgehender Schonung der labilen Sulfatesterbindungen sollten leichter analysierbare Fragmente erhalten werden; die Untersuchung dieser ZW-Spaltprodukte erlaubte zugleich Einblicke in einige wichtige Strukturprinzipien des ZW-Polysaccharids.

4.1. Fragmentierung der Zellwand durch Partialhydrolysen mit Oxalsäure

Die Behandlung der ZW mit Oxalsäure bei 100°C erlaubte eine relativ schonende Partialhydrolyse, bei der die estergebundenen Sulfatgruppen teilweise erhalten blieben. Infolge ihrer hohen Hydrolyselabilität gelang es jedoch nicht, in größerem präparativen Maßstab mit Hilfe dieser Methode sulfatisierte Oligo- oder Monosaccharide zu erhalten, wie es z.B. bei sulfatisierten Algenpolysacchariden möglich ist (Abdel-Fattah et al. 1974).

4.1.1. Untersuchung eines Partialhydrolysats nach Behandlung der Zellwand mit 0.5 m Oxalsäure

Nach Hydrolyse von 100 mg ZW-Material für 2 h mit 0.5 m Oxalsäure wurden 2 Hauptfraktionen erhalten: Fraktion A enthielt die dialysierbaren löslichen Kohlenhydratanteile des Partialhydrolysats; Fraktion B entsprach dem löslichen Anteil, der nach erschöpfender

Dialyse im Dialysierschlauch zurückblieb.

Die niedermolekulare Fraktion A wurde anschließend über eine Anionenaustauschersäule (Amberlite IRA-400) in eine neutrale (A_N) und eine saure (A_S) Fraktion aufgetrennt. In Tabelle 12 sind die Daten zur chemischen Zusammensetzung dieser Fraktionen zusammengefaßt.

Tab.12: Fraktionierung der Zellwand nach Partialhydrolyse mit 0.5 m Oxalsäure (2 h, 100°C) in eine dialysierbare neutrale (A_N), saure (A_S) und nichtdialysierbare Fraktion (B').

	$\mu\text{Mol/Fraktion}$		
	A_N	A_S	B
Glucose	2.0	0.46	19.0
Mannose	0.54	0.95	10.4
Galactose	0.34	0.33	10.2
Gesamt-Neutralzucker	2.88	1.74	39.6
Glucosamin	+ ^a	0.5	18.1
Galactosamin	- ^a	1.0	9.2
Gulosaminuronsäure	- ^a	0.05	10.0
Gesamt-Aminozucker ^b	3.4	1.6	37.3
Gesamt-Uronsäuren	0.4	3.6	27.4

a = Der Aminosäureanalysatorlauf dieser Fraktion ließ Glucosamin als Aminozucker-Hauptkomponente erkennen

b = Gesamt-Aminozuckergehalt durch Elson-Morgan-Test ermittelt.

Ähnlich den Extraktionsverfahren durch Säurebehandlung wurden auch durch die Oxalsäurehydrolyse nur etwa 10 % aller ZW-Komponenten in Form niedermolekularer Fragmente vom ZW-Polymer abgespalten. Nach Fraktionierung dieses dialysierbaren Anteils wurde erwartungsgemäß die Hauptmenge der Uronsäuren in der sauren Fraktion A_S gefunden. Daneben ergaben sich jedoch auch auffällige Trennungen im Aminozucker- und Neutralzuckerbereich: Glucose und Glucosamin bilden die Hauptkomponenten der Neutralfraktion, während die übrigen Zucker in deutlich geringerer Menge vertreten sind. Umgekehrt fallen Galactosamin als Aminozucker-Hauptkomponente und der hohe Anteil von Mannose in Fraktion A_S auf.

Aufgrund der molaren Verhältnisse der Zuckerkomponenten im polymeren nichtdialysierbaren Anteil des Partialhydrolysats (B) bestehen gewisse Ähnlichkeiten zu den unlöslichen polymeren ZW-Fractionen der Extraktionsversuche. Das annähernd geradzahlige molare Verhältnis der Bestandteile dieser Fraktion (Glucose/Mannose/Galactose/Glucosamin/Galactosamin/Gulosaminuronsäure/Uronsäuren = 2/1/1/2/1/1/3) weist auf eine definierte stöchiometrische Beziehung zwischen allen Komponenten dieses Polymers hin.

4.1.2. Trennung der niedermolekularen sauren Fraktion eines Zellwandpartialhydrolysats durch Anionenaustauscher

Eine nähere Untersuchung der bei Partialhydrolyse (0.25 m Oxalsäure, 2 h, 100°C) freigesetzten sauren ZW-Fragmente wurde durch Auftrennung des dialysierbaren Hydrolysats an Dowex 1 Acetatform versucht. Die an den Ionenaustauscher gebundenen negativ geladenen Kohlenhydrate wurden durch Rühren des Harzes mit NaCl-Lösungen zunehmender Konzentration stufenweise eluiert und die erhaltenen Fraktionen chemisch untersucht (Abb.7).

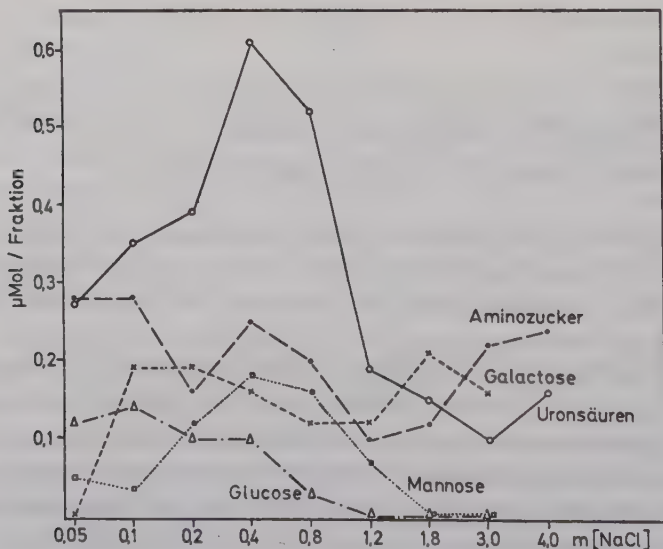


Abbildung 7:

Fraktionierung des dialysierbaren sauren Anteils der Zellwand-Partialhydrolyse durch Elution von Dowex 1 Acetatform mit einem NaCl-Stufengradienten.

In der vom Anionenaustauscher nicht gebundenen Fraktion wurden qualitativ wie quantitativ der oben analysierten Neutralfraktion A_N entsprechende Ergebnisse erhalten. Die Hauptmenge der sauren Oligo- und Monosaccharide wurde zwischen 0.1 - 0.8 m NaCl eluiert. Auffallend war der erneute Anstieg der Elution von ZW-Material bei hohen NaCl-Konzentrationen: diese ZW-Fragmente setzten sich praktisch ausschließlich aus Uronsäuren, Galactose und Aminosackern zusammen.

Das erhaltene Versuchsergebnis spricht für besondere Ladungsverhältnisse in einigen der ZW-Komponenten; eine Aussage darüber, inwieweit dieses stark elektronegative Verhalten durch Sulfat-substitution bzw. durch chemische Bindung an eine andere stark saure Kohlenhydratkomponente bedingt ist, ließ sich jedoch dadurch nicht machen. Infolge der großen Menge an freiem anorganischen Sulfat war keine quantitative Bestimmung der Sulfatestergruppen möglich.

Uronsäuren und Mannose zeigten nicht nur in diesem Experiment auffallend ähnliche Elutionsprofile. Auch nach papierelektrophoretischer Trennung eines ZW-Partialhydrolysats (0.5 m Oxalsäure, 1 h, 100°C) bei pH 5.3 in Fraktionen unterschiedlicher Wanderungsweite konnte diese Korrelation ebenso festgestellt werden.

4.1.3. Trennung, Isolierung und Charakterisierung einiger Oligosaccharide nach Oxalsäure-Hydrolyse der Zellwand

Nach Hydrolyse der ZW in 0.25 m Oxalsäure (2 h, 100°C) wurde der dialysierbare niedermolekulare Anteil des Partialhydrolysats gelchromatographisch über Biogel P-2 aufgetrennt und fraktioniert. Vorversuche mit neutralen Oligosacchariden (Mono- bis Tetrasaccharide) hatten gezeigt, daß dieses Molekularsieb auf Polyacrylamidbasis große Vorteile bezüglich der Trenneigenschaften und mechanischen Stabilität gegenüber den entsprechenden Sephadex-Gelen besitzt; eine geringe Ionenstärke war jedoch auch bei Biogel für die quantitative Elution des aufgetragenen Hydrolysats notwendig.

Abbildung 8 zeigt die Chromatographie der dialysierbaren ZW-Fragmente an Biogel P-2.

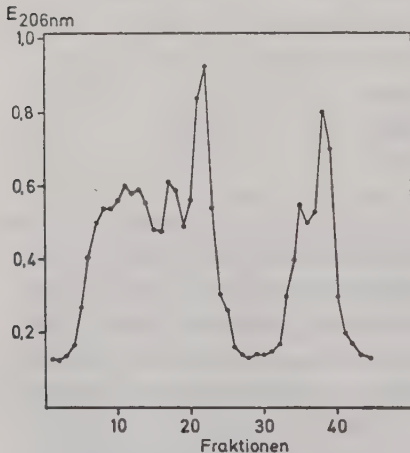


Abbildung 8:
Chromatographie des
dialysierbaren Zellwand-
Partialhydrolysats an
Molekularsieb Biogel P-2.

Wie der Nachweis reduzierender Gruppen bestätigte, fanden sich in der Fraktion 30-42 Monosaccharide und niedermolekulare Oligosaccharide, während die zuerst eluierten Fraktionen größere und entsprechend komplexere ZW-Bruchstücke enthielten. Die Analyse dieser höhermolekularen ZW-Fragmente (Tab.13) zeigte einmal, daß die Uronsäuren den quantitativ stärksten Anteil dieser Fragmente bilden. Das molare Verhältnis von Glucosamin : Galactosamin schwankte in den einzelnen Fraktionen beträchtlich (1.3 bis 0.36), wobei jedoch Galactosamin mit Ausnahme der zuerst eluierten Fraktion 5-9 jeweils die Aminozucker-Hauptkomponente darstellte. Daneben fiel wiederum der sehr geringe Anteil an Aminouronsäure in den dialysierbaren ZW-Fragmenten auf; Mannose war in relativ großen Mengen vorhanden.

Die in den Fraktionen 30-42 zusammengefaßten Oligo- und Monosaccharide wiesen im Vergleich zu den komplexeren Fraktionen eine bemerkenswert einfache Zusammensetzung auf. Uronsäuren fehlten vollständig; die einzige Aminozuckerkomponente war Glucosamin.

Tab.13: Chemische Zusammensetzung der Zellwandfragmente, die in den Fraktionen 5-23 nach Trennung über Biogel P-2 erhalten wurden.

	$\mu\text{Mol}/\text{Fraktion}$			
	Fraktion 5-9	Fraktion 10-16	Fraktion 17-19	Fraktion 20-23
Glucose	0.45	0.93	0.23	0.16
Mannose	0.46	1.15	0.19	0.14
Galactose	0.11	0.52	0.06	0.03
Glucosamin	0.36	0.54	0.15	} 0.2 ^a
Galactosamin	0.27	1.08	0.41	
Gulosaminuronsäure	0.04	0.05	0.02	
Gesamt-Uronsäuren	1.47	3.59	0.73	0.13

a = Gesamt-Aminozuckergehalt durch Elson-Morgan-Test ermittelt.

Der Vergleich von hydrolysierten und unhydrolysierten Proben auf dem Aminosäureanalysator ließ erkennen, daß ein beträchtlicher Teil dieses Aminozuckers als Monosaccharid vorlag.

Nach papierelektrophoretischer Trennung der Fraktion 30-42 bei pH 1.8 wurden 3 Hauptfraktionen erhalten: i) eine mit Ninhydrin und $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ nachweisbare Fraktion, die in der Laufweite dem Monosaccharid Glucosamin entsprach; ii) eine etwas kürzer laufende ($R_{\text{GlcNH}_2} = 0.72$) ninhydrin- und $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ -positive Fraktion X; iii) eine ninhydrin-negative und $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ -positive Fraktion N, an der Auftragslinie des Pherogramms gelegen. Zur Isolierung von Oligosacchariden wurden die Fraktionen X und N in Laufmittel F chromatographiert, eluiert, in demselben Laufmittel rechromatographiert und die so erhaltenen Oligosaccharidfraktionen untersucht. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Oligosaccharidanalyse zusammengefaßt.

Qualitativ ähnliche Oligosaccharide wurden aus der im elektrischen Feld ungeladenen Fraktion N nach papierchromatographischer Reinigung erhalten (Tab.14); hier wurde jedoch übereinstimmend ein Neutralzucker Verhältnis von Galactose : Glucose = 2:1 gefunden. Glucosamin fand sich nur in einem der Oligosaccharide;

Tab.14: Molare Verhältnisse der aus Zellwand-Partialhydrolysaten isolierten Oligosaccharide.

Fraktion	R _{GlcN} in Laufmittel F	GlcN	Gal	Glc
X _a	0.83	1	2	2
X _b	(0.67)	1.5	1	1
X _c	0.58	1	1	1
N _a	3.1	-	2	1
N _b	2.8	1	2	1

das elektroneutrale Verhalten und die negative Ninhydrin-Reaktion zeigten, daß Glucosamin in seiner N-substituierten (GlcNAc)-Form vorliegt. Zur Feststellung von Größe und reduzierendem Ende der Oligosaccharide wurde jeweils ein Aliquot mit NaBH₄ reduziert und anschließend eine quantitative Bestimmung der Oligosaccharid-Zucker durchgeführt. Durch Behandlung mit Borhydrid wird der Hemiacetalring des am reduzierenden Ende des Oligosaccharids befindlichen Zuckers geöffnet und die freie Aldehydgruppe an C-1 reduziert. Das dadurch entstandene Alditol gibt nach Hydrolyse des Oligosaccharids im Gegensatz zu intakten reduzierenden Monosacchariden keine Farbreaktion (Aminozucker- und Uronsäure-Farbttests) bzw. läßt sich nicht enzymatisch nachweisen (Neutralzuckerbestimmung).

Nach Reduktion der isolierten Oligosaccharide wurde übereinstimmend eine Abnahme von jeweils 50 % des Galactosegehalts festgestellt; Glucosamin und Glucose ergaben vor und nach Reduktion dieselben Werte. Das Ergebnis spricht dafür, daß die Oligosaccharide X_a, X_c, N_a, N_b Penta-, Hexa-, Tri- bzw. Tetrasaccharide mit Galactose jeweils am reduzierenden Ende darstellen. Im Falle des Oligosaccharids X_b war keine eindeutige Aussage möglich, da das chromatographische Bild eher auf das Vorliegen einer Mischfraktion hindeutete.

Infolge des hohen Substanzbedarfs war eine weitere Bestimmung der Monosaccharidsequenz in diesen Oligosacchariden nicht möglich.

4.1.4. Isolierung und Charakterisierung sulfatisierter Oligosaccharide aus Zellwand-Partialhydrolysaten

Die vorausgegangenen Untersuchungen an ZW-Partialhydrolysaten hatten gezeigt, daß durch die gewählten Hydrolysebedingungen eine sehr große Anzahl mehr oder weniger komplexer Oligosaccharide entsteht. Das elektrophoretische und chromatographische Verhalten von Oligosacchariden wird durch eine große Anzahl von Faktoren bestimmt wie z.B. Anzahl und chemische Natur der Monosaccharide und Substituenten; es ist daher schwierig, Oligosaccharide mit definierten chemischen Eigenschaften in brauchbaren Mengen zu erhalten. Der Isolierung von Oligosacchariden mit bestimmten Substituenten, z.B. estergebundenen Sulfatgruppen, muß deshalb ein Reinigungsschritt vorausgehen, der es möglich macht, alle anderen Oligosaccharide "herauszusieben".

Als brauchbarste Methode zur Lösung des Problems bewährte sich bei Partialhydrolysaten der ZW die Elektrophorese bei pH 1.8. Da unter diesen pH-Bedingungen nur noch Mono- oder Oligosaccharide mit stark sauren Substituenten im elektrischen Feld wandern, sollten damit Sulfat-substituierte ZW-Fragmente angereichert werden können.

4.1.4.1. Auftrennung des Partialhydrolysats durch Papierelektrophorese bei pH 1.8

Nach Partialhydrolyse und anschließender Elektrophorese des Hydrolysats bei pH 1.8 deutete die Anfärbung des Pherogramms mit $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ darauf hin, daß aus ZW-Material bei Hydrolysezeiten von 4-5 h mit 0.25 m Oxalsäure (100°C) eine maximale Freisetzung anodenwärts wandernder Oligosaccharide erfolgte. Mit längerer Hydrolysedauer konnte nur eine Zunahme der kathodenwärts wandernden bzw. ladungsneutralen Substanzen festgestellt werden. In Abbildung 9 ist das typische elektrophoretische Auftrennungsmuster der dialysierbaren ZW-Fragmente nach Partialhydrolyse gezeigt.

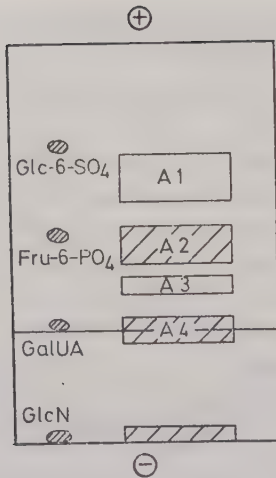


Abbildung 9:

Schema der papierelektrophoretischen Auftrennung eines Zellwand-Partialhydrolysats bei pH 1.8.

Der Nachweis der Zucker auf den Pherogrammen erfolgte in der Regel mit $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$; dabei zeigte sich, daß die auf etwa die Höhe von Fructose-6-Phosphat wandernde Fraktion (A 2), die Neutralzuckerfraktion A 4 und die Aminosucker-Monosaccharide die größten Anteile stellten. Die kathodenwärts wandernde, ninhydrin-positive Fraktion wurde nicht weiter untersucht.

Die durch Anfärbung der Randstreifen erkennbaren Fraktionen wurden mit H_2O eluiert und anschließend untersucht. Dabei wurde die Notwendigkeit einer weiteren Auftrennung dieser Fraktionen deutlich: in allen erhaltenen Fraktionen konnten alle ZW-Komponenten - wenn auch in unterschiedlichen Verhältnissen - nachgewiesen werden. Der quantitative Vergleich der anodenwärts wandernden Fraktionen (A1-A3) mit der ladungsneutralen Fraktion A 4 ließ erkennen (Tab.15), daß der größte Teil der durch Partialhydrolyse erhaltenen ZW-Fragmente im Bereich der Auftragslinie liegen bleibt. Wie die Sulfatbestimmung jedoch zeigte, scheinen verschiedene Ursachen dafür in Frage

zu kommen: neben neutralen Mono- oder Oligosacchariden, die nativ vorliegen können oder durch die Hydrolyse der Sulfat-estergruppen entstanden, finden sich auch Fragmente mit ester-gebundenem Sulfat in dieser elektrophoretisch neutralen Fraktion. Daß diese sulfatisierten Oligosaccharide im elektrischen Feld nicht oder nur sehr wenig wandern, dürfte durch positive Ladungen (Aminozucker !) oder durch das relativ hohe Molekulargewicht komplexerer Oligosaccharide begründet sein.

Tab.15: Verteilung der Zellwand-Komponenten in den anodwärts wandernden (A1-A3) und ladungsneutralen Fraktionen (A4) nach Papierelektrophorese bei pH 1.8.

	Mol% der gefundenen Komponenten					
	Amino- zucker	Uron- säuren	Glc	Man	Gal	estergeb. Sulfat
Fraktion A1-A3	25	55	10	30	30	66
Fraktion A4	75	45	90	70	70	34

4.1.4.2. Papierchromatographische Reinigung der Oligosaccharide

Die weitere Auftrennung der papierelektrophoretisch erhaltenen Fraktionen erfolgte durch Papierchromatographie im Fischer-Nebel-System (Laufmittel F). Die Chromatographiedauer zur Trennung der Oligosaccharide erwies sich dabei grundsätzlich abhängig von Größe und Sulfatisierung der Oligomeren. So konnten z.B. die Oligosaccharide der "Neutralfraktion A4" meist nach 20-stündiger Chromatographie gut getrennt werden, während zur Isolierung der langsam wandernden sulfatisierten ZW-Fragmente eine Chromatographiedauer von 40-90 h notwendig war.

4.1.4.3. Analyse der isolierten Oligosaccharide

Trotz der relativ geringen Ausbeuten waren naturgemäß Oligosaccharide, die der papierelektrophoretisch am weitesten wandernden Fraktion entstammten, für Aussagen zur Sulfatsubstitution von ZW-Zuckern am interessantesten. In Tabelle 16 sind die Resultate der quantitativen Untersuchung dieser Oligosaccharide zusammengefaßt. Sulfatisierte Monosaccharide konnten auch nach Variation der Hydrolysebedingungen nicht isoliert werden.

Tab.16: Übersicht über die quantitative chemische Zusammensetzung einiger isolierter Oligosaccharide, die estergebundenes Sulfat enthalten.

Oligo-saccharid	RGlcN in Lauf-mittel F	$\mu\text{Mol/Fraktion}$					estergeb. Sulfat
		Amino-zucker	Uron-säuren	Glucose	Mannose	Galactose	
A 1a	1.38	-	-	0.07	-	0.16	0.15
A 1b	1.24	-	-	0.04	0.02	0.16	0.18
A 1c	0.05	0.25 GalN	0.92	0.05	0.59	0.23	1.29
A 2a	0.83	0.17	-	0.08	0.02	0.15	0.16
A 2b	0.41	0.07	-	0.12	0.20	0.19	0.22
A 2c	0.31	0.12	0.12	0.19	0.27	0.12	0.25
A 3a ^a	0.45	1.22 GalN	1.33	0.35	0.40	0.45	1.62
A 3b ^a	0.24	0.29 GlcN 0.65 GalN	3.65	0.40	2.68	1.09	1.81
A 3c ^a	0.07	0.16 GlcN 1.57 GalN	4.43	0.28	1.89	0.43	1.91

^a Die Oligosaccharide wurden aus Partialhydrolysaten (0.25 m Oxalsäure, 4 h, 100°C) isoliert.

Die quantitative Übereinstimmung im Gehalt an Galactose und estergebundenem Sulfat in den ausschließlich aus Neutralzuckern bestehenden Oligosacchariden (A 1a,b) spricht für eine Sulfat-substitution der Galactosereste. Der Vergleich des Sulfatgehalts in komplexeren Oligosacchariden (A 1c, A 2a - c) mit den verschiedenen Zuckerkomponenten spricht für eine Sulfatisierung der Uronsäuren. Die Frage, ob auch Aminosucker (in erster Linie Galactosamin) und weitere Neutralzucker (Mannose ?) Sulfat-substituiert vorkommen, konnte dabei nicht beantwortet werden, da die Werte für estergebundenes Sulfat eventuell nur Minimalwerte darstellten. Eine teilweise Desulfatisierung infolge der hydrolytischen Freisetzungsbedingungen dieser Oligosaccharide konnte nicht ausgeschlossen werden. Ein teilweiser Sulfatverlust dürfte aber mit großer Wahrscheinlichkeit bei den Oligosacchariden A 3a-c vorliegen (Tab.16). Wie die Analysen einer weiteren Anzahl sulfathaltiger Oligosaccharide zeigten, scheint allen komplexeren ZW-Fragmenten im Vergleich zu einfacheren kleinen Oligosacchariden eine erhöhte Labilität der Estersulfatgruppen gemeinsam zu sein. Trotz ihrer hohen Komplexität weisen diese Oligosaccharide jedoch übereinstimmend Uronsäuren als Hauptkomponente auf und enthalten vorwiegend oder ausschließlich Galactosamin als Aminosucker.

Die hohe Säurelabilität der estergebundenen Sulfatgruppen stellte zu Beginn der Oligosaccharidanalysen ein großes Problem dar: in vielen Fällen konnte an ZW-Fragmenten kein gebundenes Sulfat nachgewiesen werden, obwohl aufgrund der elektrophoretischen Mobilität solche Substituenten gefordert werden mußten. Bei erneuter Elektrophorese konnte tatsächlich keine Wanderung zur Anode mehr festgestellt werden. Wir konnten schließlich zeigen, daß die Reste des Elektrophoresepuffers (Ameisensäure !) bei Elution des Pherogramms ausreichen, um beim Abblasen der Eluate in der Wärme Sulfat vollständig oder teilweise abzuhydrolysieren.

Neben diesen Sulfat-substituierten wurden auch zum Teil neutrale bzw. desulfatisierte ZW-Fragmente untersucht, um ein möglichst breites Spektrum verschiedener ZW-Oligosaccharide zu erhalten. In Tab.17,I sind die molaren Verhältnisse der Komponenten einiger weiterer Oligosaccharide zusammengestellt, die aus ZW-Partialhydrolysaten (0.25 m Oxalsäure, 4 h, 100°C) isoliert wurden.

Tab.17: Molare Verhältnisse der Zuckerkomponenten in Oligosaccharidfraktionen, die aus Partialhydrolysaten mit Oxalsäure (I) bzw. Schwefelsäure (II) isoliert wurden.

Oligosaccharid	R _{GlcN} in Laufmittel F	Aminozucker GlcN GalN	Uron- säuren	Glc	Man	Gal
I. A 2d	0,51	-	-	1	1	2
A 2e	0,43	-	<2	1	-	1
A 2f	0,25	1	2	0,3	-	1
A 4a	3.8	-	-	3	-	2
A 4b	1,0	1	-	6	1	1
A 4c	0,49	1	2	2	<0,5	1
II A 2g	0,12	-	1	0,2	-	0,1
A 2h	0,08	0,1	2	0,4	1	0,2
A 3d	0,14	-	4	0,3	3	1

Die bei den Fraktionen A 4a-c durchgeführte Untersuchung der Zuckerkomponente am reduzierenden Ende der Oligosaccharide zeigte in Übereinstimmung mit früheren Analysen (vgl. 4.1.3.) die vorzugsweise hydrolytische Spaltung galactosidischer Bindungen in der ZW.

4.2. Zellwand-Partialhydrolyse mit Schwefelsäure

Neben Oxalsäure ist die Partialhydrolyse mit verdünnter H_2SO_4 eine der am meisten gebrauchten Methoden zur Gewinnung sulfathaltiger Mono- oder Oligosaccharide. Die mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden isolierten Oligosaccharide zeigten eine ähnliche Zusammensetzung wie die aus Oxalsäure-Hydrolysaten erhaltenen ZW-Fragmente. In den papierchromatographisch am weitesten laufenden, bei Elektrophorese pH 1.8 negativ geladenen Oligosacchariden dominierte Galactose. Die komplexeren, bei pH 1.8 sauren Fragmente (Tab.17, II) setzten sich vor allem aus Uronsäuren, Galactosamin als mehr oder weniger ausschließlich vorhandener Aminosuckerkomponente und zum Teil Galactose bzw. Mannose zusammen.

4.3. Spezifische Spaltung des Zellwand-Polysaccharides durch desaminativen Abbau

Die Oligosaccharidanalyse der Partialhydrolysate zeigte die Probleme auf, die sich aufgrund der Vielzahl der erhaltenen ZW-Bruchstücke und der entsprechend geringen Ausbeute an gereinigten einheitlichen Oligosacchariden ergeben. Eine der wichtigsten Methoden, um ein Aminosucker-haltiges Polymer spezifisch in niedermolekulare Bruchstücke zu spalten, ist die vor allem bei der Strukturaufklärung von Mucopolysacchariden bewährte desaminative Spaltung mit salpetriger Säure. Dabei wurden in Polysacchariden, die über Aminosuckerreste mit freien Aminogruppen verfügen, diese Aminogruppen desaminiert und gleichzeitig die benachbarten glycosidischen Bindungen gespalten. Man erhält dabei Bruchstücke des Polymers, deren Größe davon abhängt, in welcher Häufigkeit solche Aminosucker im Polysaccharid vorkommen; das reduzierende Ende der erhaltenen Fragmente bildet jeweils eine durch Des-

aminierung des Aminosuckers entstandene 2.5-Anhydrohexose (Lindberg et al. 1975).

Grundvoraussetzung für die Spaltung der Halococcus-ZW mit Hilfe dieses Verfahrens war die Freilegung der durch N-Acetyl-Substituenten geschützten Aminogruppen der Hexosamine. Die Versuche zur desaminativen Spaltung der ZW wurden an 2 ZW-Präparationen durchgeführt, die einen unterschiedlichen Grad an freien Aminogruppen aufwiesen, so daß auch unterschiedlich große ZW-Fragmente zu erwarten waren.

4.3.1. Desaminative Spaltung einer partiell de-N-acetylierten Zellwandpräparation

Infolge der Alkalilabilität von N-Acetylgruppen (Jorpes et al. 1952) konnte bereits durch Inkubation mit NaOH eine partiell (30-40 %) de-N-acetylierte ZW-Präparation erhalten werden. Durch die Alkalibehandlung blieben glycosidische Bindungen sowie die Sulfatestergruppen des ZW-Polymers weitgehend erhalten (vgl. 2.5. und 3.5.2.1.).

4.3.1.1. Gewinnung und Fraktionierung von Zellwandfragmenten

Nach Behandlung partiell de-N-acetylierter ZW mit HNO_2 wurden die erhaltenen Fragmente entsprechend ihrer Größe durch Gel-filtration über eine Kombination von Sephadex G-50 und G-25 säulenchromatographisch getrennt. Die Elution der Zucker wurde durch Absorptionsmessung bei 206 nm und durch Bestimmung der relativen Mengen an Uronsäuren und Anhydrozuckern in den einzelnen Fraktionen verfolgt. Anschließend wurden die Fraktionen entsprechend dem daraus erhaltenen Peakmuster vereinigt. In Tabelle 18 sind die Untersuchungsergebnisse dieser vereinigten Fraktionen zusammengestellt.

Wie die gaschromatographische Analyse bestätigte, enthielt die Hauptfraktion 88-105 ausschließlich monomere Anhydrohexosen; erwartungsgemäß wurden also beim desaminativen Abbau der ZW nur glycosidische Bindungen von Aminosuckern gelöst. Weiter konnte gaschromatographisch gezeigt werden, daß diese Mono-saccharidfraktion praktisch ausschließlich aus Anhydromannose, dem Desaminierungsprodukt von Glucosamin besteht. Glucosamin muß folglich zumindest teilweise im ZW-Polymer unmittelbar an einen weiteren ZW- Aminosucker gebunden vorliegen.

Tab.18: Chemische Zusammensetzung der Fraktionen, die nach Zellwand-Desaminierung und anschließender gelochromatographischer Trennung der Fragmente erhalten wurden.

Haupt- fraktion	$\mu\text{Mol/ml}$							
	GlcN	GalN	GalNUA	Anhydro- Hexose	Uron- säure	Glc	Man	Gal estergeb. Sulfat
7 - 16	0.19	3.03	-	0.22	12.35	7.82	5.44	0.96 15.7
17 - 30	0.93	0.07	0.15	0.44	2.04	0.48	0.39	0.67 3.2
31 - 38	0.37	0.02	0.04	0.12	0.75	0.17	0.09	0.43 1.2
39 - 50	1.12	-	0.05	0.94	1.90	0.09	0.02	1.05 3.2
51 - 70	0.63	0.02	0.03	0.40	1.13	0.11	0.02	0.81 2.0
71 - 87	0.74	0.08	-	0.16	0.30	0.17	-	0.14 0.27
88 - 105	-	-	-	1.17	-	←	Spuren →	-

Das in der Hauptfraktion 7-16 erhaltene Material wurde nicht oder nur schwach verzögert von der Säule eluiert; wie seine Fällbarkeit mit Äthanol zeigte, besteht diese Fraktion aus hochmolekularen Polymeren, die sich neben dem hohen Uronsäure-, Glucose- und Mannosegehalt vor allem durch Galactosamin als praktisch einzigem Aminozucker auszeichnen.

Die Fraktionen mit ZW-Bruchstücken niederen Molekulargewichts enthielten im deutlichen Gegensatz dazu fast ausschließlich Glucosamin als Aminozucker und als weitere Hauptkomponenten Uronsäuren und Galactose.

4.3.1.2. Untersuchungen an der polymeren Hauptfraktion 7-16

Trotzdem es sich bei dem in Fraktion 7-16 eluierten Material um Polymere handelt, zeigten die Analysen doch ein überraschend einfaches Muster in ihrer chemischen Zusammensetzung. Die polymere Natur sowie der hohe Gehalt an estergebundenem Sulfat dieser Fraktion erlaubten es, die Frage nach der Lokalisation der Sulfatgruppen mit anderen Methoden als die der Oligosaccharidanalyse anzugehen.

Ein Aliquot der Fraktion wurde in Puffer I pH 1.8 aufgenommen und mit Cetavlon (CTAB) inkubiert (vgl. 3.4.). Das erhaltene Sediment wurde mit 2 m KCl-Lösung wieder aufgelöst und aus dem Überstand der Cetavlon-Fällung sowie dem gelösten Sediment mit Äthanol polymeres Material ausgefällt.

Die Analysen der so erhaltenen Fraktionen (Tab.19) bestätigten das Vorliegen von Polymeren mit unterschiedlichen Ladungseigenschaften. Die polymere Fraktion mit keiner oder nur geringer negativer Ladungsdichte bestand primär aus Glucose-resten; die dabei gefundene geringe Menge an Sulfatestergruppen spricht gegen eine Sulfatisierung dieses Neutralzuckers.

Tab.19: Trennung der Hauptfraktion 7-16 in ungeladene und negativ geladene Polymere durch Cetavlon-Fällung bei pH 1.8.

Fraktion	μMol/ml					
	Amino- zucker	Uron- säuren	Glc	Man	Gal	estergeb. Sulfat
CTAB- Sediment	1.29 GalN	3.84	1.53	2.33	0.47	5.98
CTAB- Überstand	0.12	0.38	2,44	0.25	0.04	0.44

Das mit Cetavlon fällbare Polymer enthielt dagegen einen sehr hohen Anteil an estergebundenem Sulfat sowie etwa 90 % der in Fraktion 7-16 enthaltenen Uronsäuren, Mannose und Galactose. Als Aminozuckerkomponente wurde nur Galactosamin gefunden. Dünnschicht- und gaschromatographische Untersuchungen der Fraktion "CTAB-Sediment" belegten das Vorhandensein beider ZW-Uronsäurekomponenten.

Der quantitative Vergleich von Kohlenhydratkomponenten und Sulfatgehalt ließ zwar die Uronsäuren als Träger estergebundener Sulfatgruppen wahrscheinlich erscheinen; unsicher blieben weiterhin Aussagen zu der bereits früher angeschnittenen Frage: Beruht das Fällungsverhalten mit Cetavlon von einzelnen Zuckern in Polymeren auf eigenen stark negativ geladenen Substituenten oder spiegelt sich damit zum Teil nur ihre strukturelle Beziehung zu anderen stark sauren Kohlenhydratresten wider (d.h. Bindung neutraler und saurer Zuckerreste in einem Heteropolymer) ?

4.3.1.3. Untersuchungen an niedermolekularen Oligosaccharid-Fraktionen

Einige der Sephadex-Fraktionen wurden mit Hilfe der üblichen Oligosaccharid-Trennmethoden weiterfraktioniert.

Nach Papierelektrophorese der Hauptfraktion 39-50 bei pH 1.8 konnte der überwiegende Teil des $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ -positiven Materials in der anodenwärts wandernden (Laufweite wie Glc-6-Sulfat)

Fraktion wiedergefunden werden. Anschließende Papierchromatographie im Laufmittel F ergab eine Trennung in 2 Fraktionen unterschiedlicher Größe: Ein kleiner Anteil der Zuckerkomponenten konnte als relativ schnell wandernde ($R_{\text{GlcN}} = 1.4$) Fraktion A 1b isoliert werden; die Hauptmenge wurde nach einer Chromatographiedauer von 46 h als Fraktion A 1c ($R_{\text{GlcN}} = 0.32$) erhalten. Tabelle 20 zeigt die Analyse der beiden Oligosaccharidfraktionen: abgesehen von geringen Mengen an Glucose und Anhydrohexose wurde ausschließlich Galactose als Zuckerkomponente des Oligosaccharids A 1b identifiziert. Die dazu gefundene Menge an estergebundenem Sulfat spricht für Sulfatsubstituierte Galactose-Reste in der ZW.

Bei der Oligosaccharidfraktion A 1c handelt es sich wahrscheinlich um ein einheitliches Oligosaccharid aus 5 Zuckern in der molaren Zusammensetzung: Uronsäuren : Glucosamin : Galactose : Anhydrohexose : Sulfat = 2 : 1 : 1 : 1 : 3; die Anhydrohexose bildet dabei das reduzierende Ende des Pentasaccharids.

Tab.20: Übersicht über die chemische Zusammensetzung einiger Oligosaccharidfraktionen, die aus den Sephadex-Hauptfraktionen 39-50 (A) bzw. 51-70 (B) erhalten wurden.

Fraktion	$\mu\text{Mol/Fraktion}$						
	GlcN	Anhydrohexose	Uronsäuren	Glc	Man	Gal	estergeb. Sulfat
A 1b	-	0.05	-	0.07	-	0.48	0.29
A 1c	0.76	0.81	1.51	0.07	0.02	0.83	2.1
B 1	0.73	0	0.60	0.13	0.02	0.87	-
B 2	0.35	0	0.35	0.09	0.03	0.47	-
B 3	0.46	0	0.03	0.13	-	0.11	-

0 = nicht bestimmt

Die in ihrer Zusammensetzung ähnliche Hauptfraktion 51-70 konnte nach Elektrophorese in 3 unterschiedlich wandernde Zonen getrennt werden: neben der elektrophoretisch neutralen Fraktion B3

wurden in Höhe von Fructose-6-Phosphat (vgl. Abb. 9) die Bande B 2 und noch weiter anodenwärts B 1 eluiert. Die chemische Zusammensetzung dieser Proben ist ebenfalls in Tabelle 20 gezeigt. Der Sulfatestergehalt konnte wegen Desulfatisierung nach Elution der Proben (vgl. 4.1.4.3.) nicht ermittelt werden; die elektrophoretische Mobilität der Proben bei pH 1.8 gab jedoch genügend Aufschluß über den Grad der Sulfatisierung.

Aus den Proben B 1 - 3 ließ sich die Tendenz sehr gut erkennen, daß Uronsäuren und Galactose vorzugsweise in den stark negativ geladenen Oligosacchariden angereichert werden. Glucosamin und Glucose schienen aufgrund ihrer Verteilung eher ungeladene Zuckerreste darzustellen, die als neutrale Oligosaccharidbestandteile passiv im elektrischen Feld "mitgeschleppt" werden.

Trotz einer geringen Menge estergebundener Sulfatgruppen in der Sephadex-Hauptfraktion 71-87 blieb der größte Teil dieser Oligosaccharide bei Papierelektrophorese in Puffer pH 1.8 auf der Auftragslinie liegen. Nachdem Glucosamin die quantitativ stärkste Komponente dieser Fraktion darstellt, spricht dieser Befund ebenfalls gegen eine Sulfatsubstitution dieses Aminozuckers.

4.3.2. Desaminative Spaltung einer weitgehend de-N-acetylierten Zellwand-Präparation

Durch Behandlung von Zellwänden mit wasserfreiem Hydrazin gelang es, polymeres Material zu erhalten, dessen Aminozuckerkomponenten zu etwa 90 % unsubstituierte Aminogruppen aufwiesen. Im Vergleich zu nativer ZW fiel der verminderte Gehalt an Glucosamin und Galactose in dieser ZW-Präparation auf; die übrigen Zuckerkomponenten zeigten ebenso wie der Gehalt an estergebundenem Sulfat keine signifikanten quantitativen Veränderungen.

4.3.2.1. Fraktionierung der Zellwand-Spaltprodukte nach Desaminierung

Nach HNO_2 -Behandlung der ZW-Präparation und anschließender Auftrennung des entsalzten Reaktionsgemisches über ein Säulensystem von Sephadex G-50/G-25 zeigte das Elutionsmuster der ZW-Komponenten keine grundlegenden Unterschiede zu den Verhältnissen,

die bei partiell de-N-acetylierter ZW gefunden worden waren (Abb.10).

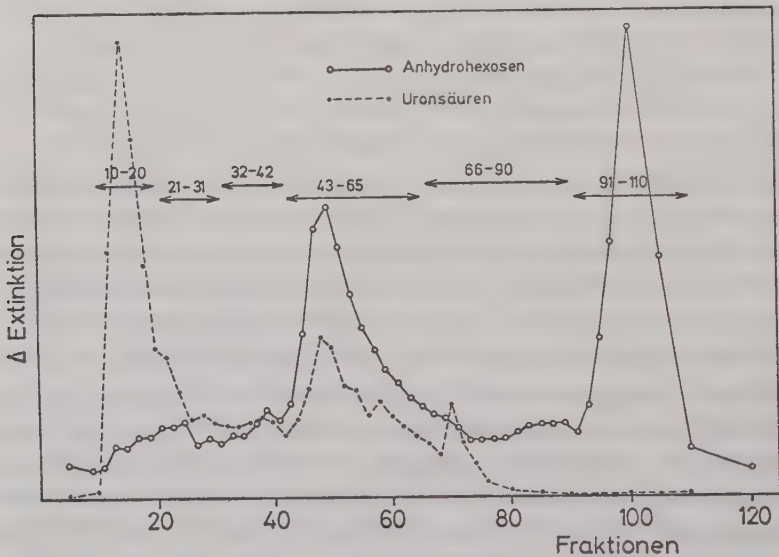


Abbildung 10:

Relative Elutionsmengen von Uronsäuren und Anhydrohexosen nach gelchromatographischer Fraktionierung von de-N-acetylierter und anschließend desaminierte Zellwand.

Augenfälligste Merkmale dieser Auftrennung waren das Uronsäuremaximum zu Beginn der Elution sowie das Anhydrohexose-Maximum in der Monosaccharidfraktion 90-110. In Tabelle 21 sind die Analysen der zu Hauptfraktionen vereinigten Einzel-fraktionen zusammengestellt. Eine quantitative Bestimmung des Anhydrozuckergehalts war nicht möglich: mehrfach wiederholte Bestimmungsversuche ergaben Werte, die weit unter den zu erwartenden Konzentrationen lagen. Eine Ursache für die Nicht-Anwendbarkeit des Anhydrozuckertests bei Hydrazin-behandelten und anschließend über Sephadex getrennten ZW-Fragmenten konnte nicht gefunden werden.

Tab.21: Chemische Zusammensetzung der Fraktionen, die nach Desaminierung und anschließender gelchromatographischer Trennung von de-N-acetylierter Zellwand erhalten wurden.

Fraktion	$\mu\text{Mol/ml}$				
	Amino- zucker	Uron- säuren	Glucose	Mannose	Galactose
10 - 20	0.47 GalN	2.58	4.87	3.39	0.33
21 - 31	0.35 "	1.21	0.63	0.89	0.35
32 - 42	0.12 "	0.98	0.78	0.72	0.42
43 - 65	0.33 GlcN	1.50	0.33	0.33	1.77
66 - 90	0.06 "	0.52	0.22	0.11	0.40
91 - 110	- ^a	Spuren	0.05	0.07	0.05

^a Anhydromannose als Desaminierungsprodukt nachgewiesen.

Bereits bei partiell de-N-acetylierter ZW wurde das gehäufte Auftreten von Uronsäuren, Glucose und Mannose in den höhermolekularen Fragmenten beobachtet. Der Anteil der Uronsäuren war jedoch hier deutlich vermindert, so daß Glucose und Mannose die Hauptkomponenten der Fraktion 10- 20 darstellen. Noch auffälliger als bei partiell de-N-acetylierter ZW zeigte die Aminosuckeranalyse, daß die Aminosubstituenten des Galactosamins durch die De-N-Acetylierungsbedingungen in deutlich geringerem Maße als die der beiden anderen Hexosamine entfernt worden waren. Diese auffallend niedrige De-N-Acetylierungsrate spricht für Substituenten in Hydroxylposition 3 des Galactosamins (Lindberg et al. 1975).

In Übereinstimmung mit den früheren Befunden bildeten Galactose und Uronsäuren die wichtigsten Bausteine des aus den Fraktionen 43 - 65 gebildeten Elutionspeaks; wie Abbildung 13 zeigt, ist in dieser Hauptfraktion auch ein beträchtlicher Anteil an Anhydrohexosen vorhanden.

Die Gaschromatographie der Hauptfraktion 91 - 110 bestätigte das Vorliegen von Anhydromannose als einzigem monomeren Zucker, der unter den vorliegenden ZW-Fragmentierungsbedingungen freigesetzt wurde.

4.3.2.2. Fraktionierungsversuche an der polymeren Hauptfraktion

10-20

Im Gegensatz zu der entsprechenden, aus partiell de-N-acetylierter ZW erhaltenen Fraktion konnte durch Inkubation mit Cetavlon bei pH 1.8 keine Trennung in deutlich voneinander unterschiedene Polymere erreicht werden. Trotz der hohen Konzentration an Sulfatestergruppen wurde die Hauptmenge des mit Äthanol fällbaren Materials im Überstand der Cetavlon-Fällung gefunden. Da die Komplexbildung von CTAB mit Polyanionen eine Funktion der Ladung und der Molekülgröße ist, konnte daraus gefolgert werden, daß die in Fraktion 10 - 20 enthaltenen ZW-Fragmente kleiner als die entsprechenden aus partiell de-N-acetylierter ZW erhaltenen sind. Diese Annahme wurde gestützt durch quantitativen Vergleich der mit Äthanol fällbaren ZW-Komponenten mit der chemischen Zusammensetzung der polymeren Fraktion vor der Fällung: während durch Äthanol-Fällung praktisch das gesamte in der Hauptfraktion 7-16 (von partiell de-N-acetylierter ZW) enthaltene Material als Polymere ausgefällt werden konnten, betrug die Menge des aus Fraktion 10-20 (von de-N-acetylierter ZW) fällbaren Materials nur etwa 30 % der eingesetzten Menge.

Gelchromatographische Trennungsversuche der Fraktion 10-20 blieben erfolglos: das gesamte, in einem einzigen Peak eluierte Material entsprach qualitativ und quantitativ der aufgetragenen Probe.

Auch der Versuch, eine Auftrennung mit Hilfe eines Ionenaustauschers (DEAE-Sephadex) zu erreichen, brachte keine Hinweise auf das Vorliegen unterschiedlich geladener Polymere: die Elution der Hauptmenge aller Zuckerkomponenten erfolgte erst gegen Ende des Puffergradienten, so daß mit 1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ weitereluiert wurde. Die erhaltenen Fraktionen unterschieden sich in ihrer Zusammensetzung nur geringfügig.

Zuletzt wurde die Fraktionierung dieses Materials an DEAE-Cellulose unter Benützung eines Stufengradienten versucht. Wie die in Tabelle 22 gezeigten Daten beweisen, wurde wiederum der größte Teil der Komponenten gleichzeitig eluiert. Während das molare Verhältnis der Neutralzucker Glucose und Mannose in allen Fraktionen annähernd gleich blieb (1.4 : 1) nahm der

Uronsäure-Anteil mit zunehmender Molarität des Elutionspuffers deutlich zu: so betrug das molare Verhältnis von Uronsäuren : Mannose z.B. in Fraktion 0.02 m: 0.18 : 1, in Fraktion 0.4 m bzw. 0.7 m: 1 :1 und in Fraktion 1.0 m sogar 1.9 : 1.

Tab.22: Chemische Zusammensetzung der mit Hilfe eines Stufengradienten an DEAE-Cellulose erhaltenen Eluate der Sephadex-Hauptfraktion 10 - 20.

Fraktion	µMol/ml					
	GalN	Uron- säuren	Glc	Man	Gal	estergeb. Sulfat
0.02 m	0.02	0.07	0.51	0.38	0.01	o
0.05 m	0.02	0.06	0.25	0.19	-	o
0.1 m	0.06	0.22	0.36	0.26	0.02	o
0.2 m	0.06	0.22	0.16	0.08	0.02	0.29
0.4 m	0.08	0.51	0.87	0.51	0.02	0.74
0.7 m	0.26	1.03	1.32	1.06	0.08	1.82
1.0 m	0.13	0.32	0.24	0.17	0.03	0.60

o = nicht bestimmt

Das chromatographische Verhalten der Fraktion 10 - 20 spricht für das Vorliegen von ZW-Fragmenten, die in Zusammensetzung und Größe relativ ähnlich sind; der polydisperse Charakter dieser Fraktion wurde jedoch erkennbar durch anteilmäßig kleine, in ihrem Uronsäuregehalt sowie der resultierenden negativen Ladung klar zu unterscheidende "Unterfraktionen" (0.02 m, 0.05 m, 0.1 m, 0.2 m, 1.0 m).

4.3.2.3. Weitere Auftrennung der Oligosaccharidfraktion 43 - 65

Nach Papierelektrophorese pH 1.8 der Sephadex-Fraktion 43 - 65 konnten 3 verschiedene anodenwärts wandernde (A,B,C) und eine elektrophoretisch neutrale Fraktion D eluiert werden. Im Gegensatz zu der kleinen am weitesten laufenden Fraktion A erlaubte die große Menge des in Fraktion B enthaltenen Materials eine weitere Auftrennung im Chromatographiesystem F (Fraktionen B 1 - B 3). Tabelle 23 faßt die bei Auftrennung der Oligosaccharidfraktion 43 - 65 erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Aufgrund der hohen Anteile von Galactose und/oder Uronsäuren in diesen Fraktionen sowie der gefundenen Mengen an Sulfat-estergruppen wurden die früheren Ergebnisse einer Sulfat-substitution dieser ZW-Zucker unterstrichen. Das Wanderungsverhalten von Glucose und Mannose spricht ebenso wie bei vorausgegangenen Untersuchungen gegen eine Sulfatisierung bzw. für eine passive Wanderung.

Tab.23: Chemische Zusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen, die nach papierelektrophoretischer und papierchromatographischer Auftrennung der Sephadex-Fraktion 43 - 65 erhalten wurden.

Fraktion	μMol/Fraktion					
	Amino-zucker	Uron-säuren	Glc	Man	Gal	estergeb. Sulfat
A	0.06	0.10	0.16	0.11	0.52	0.86
B 1	0.02	0.15	0.09	0.03	0.37	0.58
B 2	0.03	0.36	0.08	0.09	0.57	1.10
B 3	0.02	0.46	0.10	0.11	0.76	1.34
C	0.33	0.82	0.19	0.28	0.62	1.44
D	0.18	0.49	0.70	0.05	0.21	-

4.4. Zur Bindung der Aminosucker im Zellwandpolymer

Die vorangegangenen Oligosaccharidanalysen und ZW-Fraktionierungsversuche zeigten übereinstimmend, daß sich die Halococcus-ZW relativ einfach in Fragmente trennen läßt, die mehr oder weniger ausschließlich nur einen der beiden ZW-Aminosucker Glucosamin bzw. Galactosamin enthalten; nur in komplexeren Oligosacchariden fanden sich beide Aminohexosen nebeneinander. Abgesehen von diesen Hinweisen auf unterschiedliche Lokalisierung der beiden Zucker im ZW-Polymer sprach auch die auffallend unterschiedliche Freisetzungskinetik der Aminosuckermonosaccharide unter hydrolytischen Bedingungen für unterschiedliche Bindungen und Verbindungen zu anderen ZW-Zuckerkomponenten: Glucosamin wurde wesentlich schneller

als monomeres Hexosamin aus dem ZW-Polysaccharid freigesetzt als Galactosamin (Abb.11).

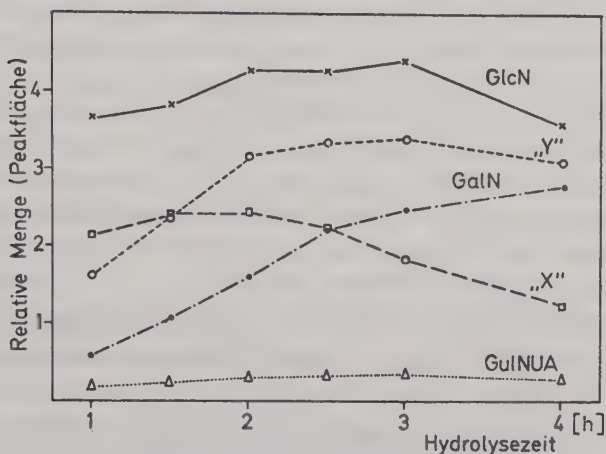


Abbildung 11:

Freisetzungskinetik der monomeren Aminosucker und der Oligosaccharide "X", "Y" während der Hydrolyse von Zellwand in 6.5 n TFA bei 100°C.

Ein Oligosaccharidgemisch, das nach Hydrolyse der ZW (1.5 n HCl, 2 h, 100°C), anschließender Adsorption an Aktivkohle und darauffolgender Desorption mit 40 % Äthanol (bei 70°C) gereinigt worden war, zeigte im Elson-Morgan-Test ein Absorptionsverhältnis von $E_{540 \text{ nm}}/E_{510 \text{ nm}} = 1.24$. Nach Cifonelli and Dorfman (1960) liegt das Absorptionsmaximum für Hexosamine, die an der Hydroxylgruppe von C-3 substituiert sind, bei 510 nm; freie Hexosamine bzw. an C-3 unsubstituierte Oligosaccharide haben bei 530 - 535 nm ein Maximum, so daß für sie ein Absorptionsverhältnis E_{540}/E_{510} von etwa 1.3 charakteristisch ist.

Dieses Versuchsergebnis spricht dafür, daß bei allen in der ZW vorhandenen Aminosuckern die Hydroxylgruppe an C-3 nicht an glycosidischen Bindungen beteiligt ist, d.h. für diese Bindungen neben der C-1 Hydroxylgruppe also nur C-4-OH und C-6-OH in Frage kommen.

4.4.1. Isolierung und Charakterisierung von 2 ninhydrin-positiven Aldobiuronsäuren

In den Aminosäureanalysatorläufen von ZW-Hydrolysaten konnten 2 auffallend große Peaks beobachtet werden, die nach einer Hydrolysezeit von 2-3 h mit 6.5 n TFA (100°C) eine maximale Größe erreichten (Abb.11). Relative Elutionszeit (auf dem Aminosäureanalysator: $R_{\text{GlcN}}^{\text{"X"}} = 0.39$; $R_{\text{GlcN}}^{\text{"Y"}} = 1.34$), Größe und Hydrolysenkinetik dieser Peaks führten zu der Annahme, daß es sich möglicherweise um ZW-Oligosaccharide mit einer oder mehreren Aminozyuckerkomponenten handelt; erwartungsgemäß konnten auch nach Perjodatbehandlung eines solchen ZW-Hydrolysats die beiden Peaks nicht mehr beobachtet werden.

Zur Isolierung der beiden Oligosaccharide aus dem Hydrolysen-gemisch erwies sich ein Verfahren mit 3 Reinigungsschritten als brauchbarste Methode:

1. Batch-Fraktionierung des Hydrolysats mit Dowex 50 H^+

Nach Neutralisation des eingeengten Hydrolysats und Entfernung der Huminsubstanzen (s.B.8.2.3.) wurde das gesamte ninhydrin-positive Material an das Harz adsorbiert. Durch Rühren des Harzes mit 0.8 n HCl wurde die Fraktion eluiert, in der das Oligosaccharid "X" angereichert vorlag. Durch die anschließende Elution mit 3 n HCl konnte die zur Isolierung von "Y" benötigte Fraktion erhalten werden. Nach Neutralisation mit festem AgCO_3 und anschließender Zentrifugation erfolgte

2. Reinigung der Oligosaccharide durch Papierchromatographie

Zur Entfernung der Aminozyucker-Monosaccharide eignete sich die Chromatographie in Laufmittel F für ca. 60 h. Die beiden Oligosaccharide konnten als ninhydrin- und $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ -positive Zonen mit $R_{\text{GlcN}} = 0.26$ ("X") bzw. 0.17 ("Y") gefunden werden. Nach Elution der entsprechenden Banden mit 0.01 n HCl erfolgte als weiterer Reinigungsschritt

3. Papierelektrophorese der Oligosaccharide bei pH 1.8.

Das Oligosaccharid "Y" wies mit einem Wert von $R_{\text{GlcN}} = 1.2$ eine um das doppelte höhere elektrophoretische Mobilität als "X" ($R_{\text{GlcN}} = 0.6$) auf.

Die Untersuchung der chemischen Zusammensetzung beider Oligosaccharide erbrachte das in Tabelle 24 gezeigte Bild.

Tab.24: Molare Verhältnisse der Oligosaccharidkomponenten vor und nach Reduktion der Oligosaccharid-Fractionen.

Komponenten	Oligosaccharid "X"		Oligosaccharid "Y"	
	unbehandelt	reduziert	unbehandelt	reduziert
Glucosamin	-	-	1	-
Galactosamin	1	-	-	-
Gulosaminuronsäure	-	-	1	1
Hexosaminitol	-	1	-	1
Uronsäure	1	1	-	-

Beide Oligosaccharidfraktionen waren von Neutralzuckerkomponenten weitgehend frei. Allein das Oligosaccharid "X" reagierte im Uronsäuretest positiv und enthielt äquimolare Mengen an Uronsäure und Galactosamin; "Y" dagegen enthielt ausschließlich die Hexosamine Glucosamin und Gulosaminuronsäure in ebenfalls gleichen Mengen.

Durch die Modifikation des am reduzierenden Ende der Oligosaccharide befindlichen Zuckers konnten wir Aufschluß über die Sequenz der Zuckerbausteine und die Größe des ZW-Fragments erhalten: Reduktion der Oligosaccharidfraktion mit NaBH_4 führte bei "X" dazu, daß im Elson-Morgan-Test keine Aminosucker mehr nachweisbar waren; der Uronsäuregehalt wurde durch diese Behandlung nicht verändert. Nach Ermittlung des spezifischen molaren Absorptionskoeffizienten konnte mit Hilfe des Aminosäureanalysators gezeigt werden, daß dem Verschwinden des Galactosamin-Peaks das Auftreten eines quantitativ äquivalenten Hexosaminitolpeaks entsprach (Tab.24). Oligosaccharid "X" ist daher ein Disaccharid, das aus Uronsäure und Galactosamin als reduzierendem Ende besteht.

Zur Feststellung, welche Uronsäure in diesem Disaccharid vorliegt, wurde ein Aliquot der Fraktion unter Bedingungen reduziert, die eine Überführung der Uronsäure in den entsprechenden Neutralzucker ermöglichten. Bei der anschließenden Neutralzucker-

bestimmung konnte ausschließlich Glucose in signifikanten Mengen nachgewiesen werden: Glucuronsäure bildet folglich das nichtreduzierende Ende des Disaccharids.

Eine weitere Bestätigung dieser Befunde konnte durch Inkubation eines Gemisches von Uronsäure-haltigen, nachträglich N-acetylierten Oligosacchariden mit β -Glucuronidase erhalten werden. Nach enzymatischer Behandlung dieser zu einem hohen Anteil aus dem Disaccharid "X" bestehenden Fraktion konnte eine deutliche Zunahme von N-Acetyl-Hexosaminen im Morgan-Elson-Test nachgewiesen werden. Daraus ließ sich das Vorliegen von Disacchariden ableiten, die aus Glucuronsäure und einem Aminozucker als reduzierendem Ende zusammengesetzt sind. Zusammen mit den obigen Ergebnissen sprechen diese Befunde dafür, daß im Disaccharid "X" Galactosamin β -glycosidisch mit Glucuronsäure verbunden ist.

Durch Reduktion des Oligosaccharids "Y" verminderte sich der Aminozuckergehalt um annähernd 50 %. Wie die Aminosäureanalysatorläufe von Hydrolysaten unbehandelter bzw. reduzierter Proben bestätigten (Tab.24), entsprach dieser Aminozuckerabnahme das Verschwinden des Glucosaminpeaks, während der Gulosaminuronsäure-Gehalt keine quantitativen Veränderungen erkennen ließ; die nach Reduktion gefundene Hexosaminitol-Menge entsprach quantitativ dem Glucosamin-Gehalt der unbehandelten Probe. Diese Ergebnisse erlaubten eine Charakterisierung von "Y" als Disaccharid, bestehend aus Gulosaminuronsäure und Glucosamin als reduzierendem Ende.

Auf Grund der Tatsache, daß beide Disaccharide eine Aminohexose als reduzierendes Ende aufwiesen, war die Bestimmung der Position glycosidischer Bindungen mit Hilfe des Elson-Morgan- und des Morgan-Elson-Tests möglich: wie erwähnt, ist in beiden Tests für eine Chromophorbildung das Vorliegen einer unsubstituierten reduzierenden Hydroxylgruppe an C-1 des Aminozuckers notwendig; eine weitere Voraussetzung ist im Falle des Elson-Morgan-Tests eine freie Hydroxylgruppe an C-3, im Falle des Morgan-Elson-Tests eine freie unsubstituierte OH-Gruppe an C-4 des N-Acetylaminozuckers.

Im Elson-Morgan-Test wurden für gleiche Mengen des Disaccharids "X" vor und nach der Totalhydrolyse dieselben Extinktionswerte gemessen; hydrolysierte Proben von "Y" ergaben annähernd doppelt so hohe Extinktionen wie äquivalente Mengen der unhydrolysierten Probe. In Übereinstimmung dazu konnte bei beiden Oligosacchariden ein Wert von etwa 1.3 für das Absorptionsverhältnis E_{540}/E_{510} ermittelt werden. Damit wurde gezeigt, daß Galactosamin und Glucosamin in den Disacchariden "X" bzw. "Y" nicht an der C-3 Hydroxylgruppe glycosidisch substituiert sind.

Entsprechende Versuche wurden an N-acetylierten Proben bzw. an nach Hydrolyse der Disaccharide N-acetylierten Proben unter Verwendung des Morgan-Elson-Tests durchgeführt. Beide Disaccharide zeigten im Gegensatz zu den hydrolysierten Proben nur sehr geringe Extinktionswerte, so daß auf eine glycosidische Substitution der Hydroxylgruppe in Position 4 von Galactosamin bzw. Glucosamin geschlossen werden konnte.

Die vorliegenden Ergebnisse charakterisieren die beiden Oligosaccharide "X" und "Y" als Disaccharide, die aus einer Uronsäure (im Falle von "Y" einer Amino-Uronsäure) und einem Aminozucker am reduzierenden Ende bestehen; diese Zucker sind 1 → 4 glycosidisch miteinander verbunden. Disaccharide dieses Typs (Aldobiuronsäuren = Disaccharide mit einer Uronsäure am nicht-reduzierenden Ende) zeichnen sich durch hohe Hydrolysestabilität aus und stellen daher oft die Haupthydrolyseprodukte Uronsäurehaltiger Polymere dar (Lindberg et al. 1975).

4.4.2. Hinweise für ein Disaccharid : Glucosamin → Galactose

Neben den Aldobiuronsäuren existiert ein weiterer Typ hydrolysestabiler Disaccharide: er ist gekennzeichnet durch das Vorliegen eines Aminozuckers mit freier Aminogruppe am nicht-reduzierenden Ende des Oligosaccharids. Durch den induktiven Effekt des bei saurer Hydrolyse entstehenden NH_4^+ -Ions wird die benachbarte glycosidische Bindung stabilisiert, und damit die Bildung solcher Fragmente begünstigt.

Neutralzuckerbestimmungen in ZW-Partialhydrolysaten ließen erkennen, daß durch Desaminierung dieser Proben mit HNO_2 eine Freisetzung von Galactose-Monosacchariden hervorgerufen werden konnte. Zur näheren Untersuchung dieses Befundes wurde weitgehend de-N-acetylierte ZW (vgl. 4.3.2.) einer Hydrolyse von unterschiedlicher Dauer unterworfen (2n TFA, 100°C ; 1,5, 3, 5 h). Die Hälfte des Partialhydrolysats wurde anschließend mit HNO_2 behandelt, worauf sich eine Neutralzuckerbestimmung der so erhaltenen Proben anschloß. Während für Glucose und Mannose unabhängig von der Hydrolysedauer eine Monosaccharid-Zunahme von 10-20 % nach Desaminierung gemessen wurde, steigerte sich die durch Desaminierung hervorgerufene Freisetzung von Galactose mit zunehmender Hydrolysedauer; die nach 5-stündiger Hydrolyse erhaltene Galactose-Menge wuchs nach der HNO_2 -Behandlung um mehr als das 3,5-fache an (Galactose-Monosaccharid-zunahme nach Desaminierung : > 250 %).

Damit wurde gezeigt, daß Galactose in hydrolysestabilen Oligosacchariden das reduzierende Ende bildet und mit einem Aminozucker glycosidisch verbunden ist.

Mit Hilfe gaschromatographischer Untersuchungen konnte die Identität des mit Galactose glycosidisch verbundenen Aminozuckers geklärt werden. Die Desaminierungsprodukte der ZW-Aminozucker (Anhydromannose aus Glucosamin, Anhydrotalose aus Galactosamin) lassen sich als Alditolacetate am Gaschromatographen gut unterscheiden. Weiterhin ist eine gaschromatographische Differenzierung möglich zwischen desaminierten Hexosaminitolen und Anhydromannose-Monosacchariden, die durch Desaminierung freigesetzt wurden.

Durch Reduktion von Hydrolysaten de-N-acetylierter ZW mit NaBH_4 und anschließender Desaminierung konnte damit unterschieden werden zwischen: i) Anhydrosuckern, deren reduzierende Hydroxylgruppe an C-1 bereits vor Desaminierung einer Reduktion mit NaBH_4 zugänglich war. Bei diesen desaminierten Hexosaminitolen handelte es sich um Aminozucker-Monosaccharide, die während der Hydrolyse freigesetzt, dann reduziert und anschließend desaminiert wurden. ii) Anhydromannoseresten, die erst nach Desaminie-

rung als Monomere freigesetzt wurden und folglich vorher das nichtreduzierende Ende eines Oligosaccharids darstellten.

In Gaschromatogrammen entsprechend behandelter ZW-Hydrolysate wurde übereinstimmend Anhydromannose als der Anhydrozucker identifiziert, der durch Desaminierung in monomerer Form freigesetzt wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Glucosamin und Galactose in der ZW zumindest teilweise in der Sequenz Glucosamin $\rightarrow$ Galactose vorliegen.

5. Perjodat-Oxidation der Zellwand

Zur Aufklärung von Bindungs- und Substitutionsverhältnissen der einzelnen Zuckerkomponenten eines Polysaccharids ist die Perjodatoxidation eine der am meisten verwendeten Methoden. Durch die oxidative Wirkung von Perjodat werden die C-C-Bindungen von Glycolgruppierungen, also benachbarter Hydroxyl- (und Amino-)Gruppen gespalten, so daß aufgrund der Perjodatlabilität eines Zuckers bereits oft schon Aussagen über seine glycosidischen Bindungsverhältnisse im Polymer gemacht werden können. Umgekehrt spricht die Perjodatesistenz eines Zuckers für das Vorliegen von Bindungen oder Substituenten, die vicinale Glycolgruppierungen im Molekül verhindern.

Durch Perjodat-Behandlung der Halococcus-ZW sollten einmal unsere Befunde hinsichtlich der Sulfatsubstitution einzelner Zuckerkomponenten überprüft werden; zudem wurde versucht, Auskunft über die Positionen der glycosidischen Bindungen in ZW-Zuckern zu erhalten.

5.1. Untersuchung Perjodat-behandelter Zellwand-Präparationen

Ein Vergleich der Perjodat-Labilität der Zuckerkomponenten in nativer und in desulfatisierter ZW bot sich zur Untersuchung der Frage an, bei welchen der ZW-Zucker ein Sulfatsubstituent perjodatlabile Glycolgruppierungen blockiert bzw. welche Hydroxylgruppen für eine solche Substitution in Frage kommen. Voraussetzung für diesen Vergleich waren ZW-Präparationen, die sich - abgesehen vom Sulfatgehalt - möglichst nicht voneinander unterschieden.

Im Vergleich mehrerer Verfahren zur Desulfatisierung der ZW erwies sich die erst kürzlich von Choi and Meyer (1975) beschriebene Methode als die am besten geeignete: neben einer hohen Ausbeute (ca. 90 %) wies das so erhaltene ZW-Material eine qualitativ und quantitativ gut mit unbehandelter wasserlöslicher ZW vergleichbare Zusammensetzung auf. Der Sulfatgehalt dieser - wie die geringe Absorption des IR-Spektrums bei 1240 cm^{-1} bestätigte - weitgehend desulfatisierten ZW betrug nur noch 20 % der unbehandelten ZW. Durch die Desulfatisierung wurden in nur geringem Maße glycosidische Bindungen gespalten: bei Bestimmung der reduzierenden Gruppen wurden $0.05\text{ }\mu\text{Mol}$ Reduktionsäquivalente/mg desulfatisierter ZW gemessen.

Die elektrostatischen Ladungen negativ geladener Polymere sind oft die Ursache für geringe Oxidationsraten, da sie herantretende Perjodationen wieder abstoßen. Um diesen Repulsions-effekt zu reduzieren, wurde dem Oxidationssystem zum Teil Na-Perchlorat als inerte Elektrolyt in einer Konzentration von 0.2 m beigegeben (Fransson 1974). Mehrere vergleichende Untersuchungen an nativer ZW bzw. wasserlöslichen ZW-Präparationen zeigten jedoch keine Abhängigkeit der Oxidationsraten von der Gegenwart dieses Salzes. In Abbildung 12 ist der zeitliche Ver-

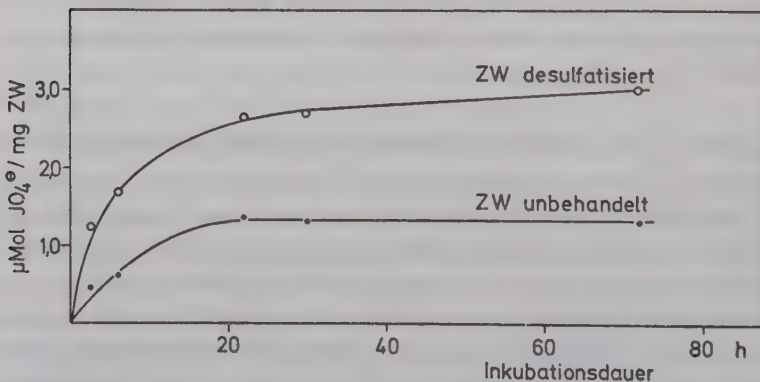


Abbildung 12:

Oxidationsraten wasserlöslicher Zellwand-Präparationen in 0.025 m NaJO_4 , 0.2 m NaClO_4 bei 4°C .

lauf des Perjodatverbrauchs bei Inkubation mit löslichen, N-acetylierten ZW-Proben in ungepuffelter Lösung dargestellt. Da die Hexosamine der nativen Halococcus-ZW keine unsubstituierten Aminogruppen aufweisen, war eine nachträgliche N-Acetylierung der wasserlöslichen ZW-Präparationen notwendig, um die während der Solubilisierung teilweise entfernten (alkalilabilen) N-Acetylgruppen zu ersetzen.

Der wesentlich höhere Perjodatverbrauch von desulfatisierter ZW sprach für eine Freilegung Perjodat-empfindlicher Glycolgruppierungen durch Desulfatisierung. Während bei unbehandelter ZW bereits nach etwa 24 h die Oxidation zum Stillstand kam, konnte bei desulfatisierten Proben ein stetiger, wenn auch geringer Perjodatverbrauch selbst nach 72 h festgestellt werden; dies spricht für eine Überoxidation d.h. eine langsame, unspezifische Oxidation, die auch nach Spaltung aller vicinalen Hydroxylgruppen beobachtet werden kann (Danishefsky et al.1970).

Um die in ungepufferten Perjodat-Oxidationssystemen oft beobachtete zunehmende pH-Erniedrigung und Überoxidation (Miyaji and Misaki 1973) zu vermeiden, wurde deshalb zur Analyse der Zusammensetzung perjodatbehandelter ZW-Präparationen die Oxidation in gepufferten Lösungen vorgenommen.

Neben den N-acetylierten ZW-Präparationen wurde auch eine Probe von weitgehend de-N-acetylierter ZW (vgl. 4.3.2.) mit 0.05 m NaJO_4 in 0.05 m Acetatpuffer in Gegenwart von 0.2 m NaClO_4 für 48 h bei 4°C oxidiert. Tabelle 25 zeigt die Zusammensetzung der unter diesen Bedingungen oxidierten Zellwände (1.Oxidation).

Die chemische Untersuchung der ZW-Komponenten nach Perjodat-oxidation der N-acetylierten ZW-Präparationen zeigte eine gute Übereinstimmung mit den an nativer ZW erhaltenen Resultaten. Auffälligste Merkmale dieser ZW-Oxidation waren der unveränderte Aminosucker- und Galactosegehalt sowie die hohe Oxidationsrate der Mannosereste. Die Glucose- und Uronsäurereste wurden durch Perjodatoxidation nur teilweise zerstört; die gaschromatographischen Analysen ergaben keine Hinweise auf die selektive Oxidation einer der beiden ZW-Uronsäurekomponenten.

Tab.25: Chemische Zusammensetzung verschiedener Zellwand-Präparationen nach 1 bzw. 2 Oxidationszyklen (Smith-Abbau) mit 0.05 m NaJO_4 in 0.05 m Acetatpuffer pH 5.5 und 0.2 m NaClO_4 .

	Mol%				
	Amino- zucker	Uron- säuren	Glucose	Mannose	Galac- tose
Unbehandelte ZW					
vor Oxidation	100	100	100	100	100
1. Oxidation	100	78	70	26	96
2. Oxidation	74	24	2.7	16	68
De-N-acetyl.ZW					
vor Oxidation	100	100	100	100	100
1. Oxidation	58	81	83	26	93
2. Oxidation	11	14	1.6	8	38
Desulfatisierte ZW					
vor Oxidation	100	100	100	100	100
1. Oxidation	100	63	57	18	90
2. Oxidation	68	17	1.4	5	45

Wie zu erwarten war, zeigten die Oxidationsraten der Zuckerkomponenten von unbehandelter und de-N-acetylierter ZW mit Ausnahme der Aminosucker keine auffälligen Unterschiede. Die Perjodatlabilität der Hexosamine in de-N-acetylierten ZW-Präparationen spricht dafür, daß in den Aminosuckern der Halococcus-ZW zumindest teilweise den Aminogruppen freie Hydroxylgruppen benachbart sind. In Perjodat-Oxidationsversuchen an Zellwänden mit unterschiedlichem Anteil freier Aminogruppen konnte zudem eine lineare Beziehung zwischen dem Verhältnis unsubstituierte Aminosucker/Gesamt-Aminosucker und der Perjodatoxidationsrate der Hexosamine festgestellt werden. Andererseits wurde durch Reduktion nativer ZW mit NaBH_4 gezeigt, daß die Halococcus-ZW keine reduzierenden (d.h. an C-1-OH unsubstituierte) Zuckerkomponenten in nachweisbaren Mengen besitzt. Diese Ergebnisse

sprechen für eine glycosidische Substitution der ZW-Aminohexosen in Position 1 und 4.

Die Analyse der Aminosuckerzusammensetzung nach Perjodatbehandlung de-N-acetylierter ZW zeigte, daß nicht alle Aminosucker in gleichem Ausmaß zerstört wurden: Während Gulosaminuronsäure fast vollständig und Glucosamin zu 42 % zerstört wurden, blieb Galactosamin praktisch vollständig erhalten. Um festzustellen, ob dieser auffällige Unterschied in der Perjodatresistenz seine Ursache in einer Sulfatester-Substitution an C-3-OH des Galactosamins haben könnte, wurde eine Probe von de-N-acetylierter ZW mit methanolischer HCl desulfatisiert und nach anschließender Perjodatbehandlung mit dem entsprechenden Ergebnis der sulfathaltigen ZW-Probe verglichen. Bei gleichbleibenden Oxidationsraten für die Aminosucker Glucosamin und Gulosaminuronsäure konnte nach Desulfatisierung eine Abnahme des Galactosamingehalts um etwa 30 % festgestellt werden.

Der Vergleich von unbehandelter und desulfatisierter ZW nach Oxidation erbrachte das überraschende Ergebnis, daß die Desulfatisierung nur eine relativ geringe Zunahme perjodatlabiler Zuckerkomponenten hervorgerufen hatte. Demzufolge müßten die ZW-Zucker in einer Weise miteinander glycosidisch verknüpft sein, daß auch nach Entfernung der Sulfatsubstituenten keine Perjodat-sensitiven Glycolgruppierungen auftreten. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den gefundenen signifikanten Unterschieden im Perjodatverbrauch (vgl. Abb. 12).

Eine zumindest teilweise Klärung dieses Problems gelang durch Modifikation der Oxidationsbedingungen. Wie Fransson (1974) an Mucopolysacchariden feststellte, zeigen die Oxidationsraten in einem Glucuronsäure-haltigen Polysaccharid eine auffallende Abhängigkeit von Temperatur- und pH-Bedingungen der Perjodatbehandlung.

Eine Nebenreaktion der Perjodatoxidation, die bei vielen neutralen und sauren Polysacchariden beobachtet wurde (Lindberg et al. 1975) kam ebenfalls zur Erklärung der Widersprüche in Frage: die bei der Oxidation von Zuckerresten entstehenden

Aldehydgruppen können mit freien OH-Gruppen intakter Zuckerkomponenten Hemiacetale bilden und so eine Oxidation dieser Zucker verhindern. Die Hemiacetalbindungen lassen sich reduktiv lösen, so daß im Falle einer auf Hemiacetalbildung beruhenden "Unteroxidation" nach NaBH_4 -Behandlung des oxidierten Polysaccharids weitere Zuckerkomponenten oxidierbar sind.

Unter Berücksichtigung dieser Befunde wurden die Oxidationsexperimente an unbehandelter bzw. desulfatisierter ZW wiederholt. Nach einer Inkubationsdauer von 72 h bei RT in einer Lösung von 0.05 m NaJO_4 in 0.01 m Phosphatpuffer pH 7 wurde ein Teil der oxidierten ZW-Präparation mit NaBH_4 reduziert und anschließend unter denselben Reaktionsbedingungen weiteroxidiert. In Tabelle 26 sind die erhaltenen Versuchsergebnisse zusammengestellt.

Tab.26: Chemische Zusammensetzung von unbehandelter bzw. desulfatisierter Zellwand nach Perjodatoxidation (I) bzw. nach darauffolgender Reduktion und Reoxidation (II).

	Mol%				
	Aminozucker	Uronsäuren	Glucose	Mannose	Galactose
Unbehandelte ZW					
vor Oxidation	100	100	100	100	100
nach Oxidation I	93	84	61	31	100
nach Oxidation II	81	76	39	26	91
Desulfatisierte ZW					
vor Oxidation	100	100	100	100	100
nach Oxidation I	88	52	27	7	49
nach Oxidation II	78	37	15	5	42

Der Vergleich der Oxidationsraten nach der ersten Perjodatbehandlung und nach Reoxidation des reduzierten "Oxo-Polysaccharids" spricht deutlich für eine "Unteroxidation" der ZW infolge intermolekularer Hemiacetalbindungen. Während Uronsäuren, Mannose und Galactose weniger davon betroffen schienen (vgl. Tab. 25 und 26), konnte insbesondere bei den Glucoseresten der ZW eine Oxidationshemmung aufgrund solcher Bindungen gezeigt werden. Daß eine der-

artige Hinderung von bestimmten oxidierten Zuckerresten ausgeht, wurde bei Oxidationsversuchen an polymeren, fraktionierbaren ZW-Fragmenten (Sephadex-Fraktion 7-16; siehe 4.3.1.1.) deutlich: während die unfraktionierten, in erster Linie aus Uronsäuren, Mannose, Glucose und Galactosamin bestehenden Polymere ähnlich wie native ZW eine Glucoseoxidationsrate von ca. 30 % aufwiesen, zeigte die Oxidation der CTAB-fraktionierten, primär aus Glucoseresten zusammengesetzten Probe (vgl. 4.3.12.) eine Glucoseabnahme von 77 %.

Auch bei den Hexosaminen spielt die Hemiacetalbildung eine Rolle: Nach Reduktion einer JO_4^- -behandelten Probe von de-N-acetylierter und anschließend desulfatisierter ZW konnte durch Reoxidation eine Aminosuckerabnahme um über 50 % erzielt werden.

Die in pH, Temperatur und durch das Fehlen von NaClO_4 gegenüber früheren Versuchen (Tab.25) veränderten Inkubationsbedingungen wirkten sich in drastischen Unterschieden in der Oxidierbarkeit von Galactose und Uronsäuren vor bzw. nach ZW-Desulfatisierung aus (Tab.26). Zwar dürfte ein gewisser Teil der Zuckerabnahme zu Lasten der bei langer Inkubationsdauer und höherer Temperatur bevorzugt auftretenden Überoxidation gehen (vgl. Oxidationsraten der "theoretisch" resistenten Aminosucker), doch spricht das Ergebnis zweifellos für Oxidations-verhindernde Sulfatsubstituenten der Uronsäure- und Galactosereste.

5.2. Smith-Abbau der Zellwand

Eine der in der Polysaccharid-Chemie am häufigsten verwendeten spezifischen Abbau-Techniken ist der sog. Smith-Abbau; er beinhaltet die Reduktion des Perjodat-oxidierten Polysaccharids mit Borhydrid und anschließende Hydrolyse unter milden Bedingungen. Durch Reduktion der aldehydischen Gruppen entsteht das Polyhydroxyderivat des "Oxopolysaccharids", dessen acyclische Acetale wesentlich hydrolyselabiler als die glycosidischen Bindungen intakter Zuckerreste sind. Sehr milde saure Hydrolysebedingungen erlauben deshalb bereits die Freisetzung charakteristischer Oxidationsprodukte wie z.B. C_2 - C_4 -Polyole, Glycolaldehyd und Glycerinaldehyd. Durch diese Abbauprodukte lassen

sich oft gute Rückschlüsse auf die glycosidische Bindung des oxidierten Zuckerrestes ziehen.

In Tabelle 25 ist die chemische Zusammensetzung verschiedener ZW-Präparationen nach Smith-Abbau (1. Oxidation) bzw. nach anschließender Reoxidation (2. Oxidation) gezeigt. Da trotz der milden Hydrolysebedingungen im Smith-Abbau estergebundene Sulfatgruppen der ZW praktisch quantitativ hydrolysiert wurden, dürfte der Rückgang der verschiedenen Zuckerkomponenten im 2. Oxidationszyklus auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein: neben dem Freiwerden neuer, perjodatlabiler OH-Gruppierungen aufgrund der im Smith-Abbau entfernten Aldehyde spielen sicher Desulfatisierung und die bereits erwähnte reduktive Lösung halb-acetalischer Bindungen eine wichtige Rolle.

Die hohe Perjodat-Oxidationsrate der Mannose im 1. Oxidationszyklus und die von Glucose im 2. Zyklus (Tab.25) erlaubten es, über die Bestimmung der Polyol-Oxidationsprodukte Aussagen zur glycosidischen Bindung dieser Zucker zu erhalten. Im Falle einer $1 \rightarrow 4$ glycosidischen Bindung sollte bei beiden Zuckerkomponenten der C_4 -Polyalkohol Erythrit, im Falle einer $1 \rightarrow 2$ oder $1 \rightarrow 6$ -Bindung Glycerin als Oxidationsprodukt zu erwarten sein.

Die Gaschromatogramme von hydrolysiertem ZW-Material nach Smith-Abbau sowie nach Reduktion der reoxidierten ZW zeigten das Vorliegen von Glycerin und Erythrit. Die unterschiedliche Perjodatlabilität von Mannose und Glucose in beiden Oxidationszyklen machten mit Hilfe der quantitativen Glycerinbestimmung eine Zuordnung der Oxidationsprodukte möglich. Die nach Smith-Abbau von unbehandelter ZW erhaltene Glycerinmenge betrug ein Vielfaches der im 2. Zyklus (mit anschließender Reduktion und Hydrolyse) freigesetzten Menge. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß Glycerinmoleküle die Oxidationsprodukte von Mannose darstellen. Eine Bestätigung dafür ergab sich aus der Tatsache, daß nach dem 1. wie dem 2. Oxidationszyklus Glycerinmengen erhalten wurden, die quantitativ sehr gut dem Mannoseverlust nach der jeweiligen Perjodatbehandlung entsprachen.

Threose, das Oxidationsprodukt $1 \rightarrow 4$ gebundener Galactose konnte erst nach der 2. Oxidation gaschromatographisch in nennenswerten Mengen nachgewiesen werden.

Die durch Smith-Abbau erhaltenen Ergebnisse sprechen deshalb für eine 1 $\rightarrow$ 2 und/oder 1 $\rightarrow$ 6 glycosidische Bindung der Mannosereste und für eine 1 $\rightarrow$ 4 Bindung der Glucose- und Galactosemoleküle in der ZW.

6. Methylierungsanalyse der Zellwand*

Die wichtigste Methode zur Aufklärung von Bindungs- und Substitutionspositionen in Polysacchariden ist die Methylierungsanalyse. Man versteht darunter die vollständige Methylierung aller freien Hydroxylgruppen des Polysaccharids (Permethylierung) mit anschließender Hydrolyse der glycosidischen Bindungen des Polymers und geeignetem Nachweis der daraus erhaltenen partiell methylierten Monosaccharide. Die Positionen glycosidischer Bindungen oder Substituenten im Polysaccharid sind daher durch freie OH-Gruppen des partiell methylierten Monosaccharids gekennzeichnet.

Unter den verschiedenen zur Methylierung von Polysacchariden beschriebenen Methoden stellt die Methylierung nach Hakomori (1964) das gegenwärtig effektivste, einfachste und deshalb am meisten verwendete Verfahren dar. Auch die Methylierung der Halococcus-ZW wurde nach dieser Methode durchgeführt.

Ziel dieser Untersuchungen war es, durch Vergleich unbehandelter und desulfatisierter ZW-Präparationen Auskunft über die glycosidischen Bindungsverhältnisse der Neutral- und Aminozucker zu erhalten, sowie eine definierte Aussage über die Positionen ester-gebundener Sulfatgruppen in den entsprechenden Zuckerkomponenten machen zu können. Da die Methylierungsprodukte der Uronsäuren unter den zur Methylierungsanalyse benutzten Bedingungen nicht analysiert werden können, wurden neben wasserlöslichen, N-acetylierten ZW-Präparationen auch Carboxyl-reduzierte, N-acetylierte Zellwände vor und nach Desulfatisierung analysiert. Keinen Erfolg brachte der Versuch, mit Hilfe von Bordeuterid die Uronsäuren in methylierten ZW-Präparationen zu den entsprechenden Neutralzuckern zu reduzieren, um massenspektrometrisch zwischen

* Die vorliegenden Untersuchungen wurden am Max Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg i.Br. durchgeführt.

nativen Neutralzuckern und "ehemaligen" Uronsäuren differenzieren zu können.

6.1. Methylierung der Zellwandpräparationen

In dem von Hakomori (1964) beschriebenen Verfahren wird das Polysaccharid mit der Base Methylsulfinylmethyl-natrium in Dimethylsulfoxid (DMSO) umgesetzt. Die durch Deprotonierung ionisierten freien Hydroxylgruppen des Polysaccharids reagieren mit Methyljodid unter Bildung des permethylierten Zuckerpolymeres.

Nachdem die gesamte Reaktion mit DMSO als Reagens und zugleich Lösungsmittel abläuft, mußte zuerst ein Weg gefunden werden, um das ZW-Material in DMSO in Lösung zu bringen. Die beobachtete Unlöslichkeit der ZW in diesem Lösungsmittel trifft auch für viele andere Polysaccharide zu, insbesondere solche mit stark sauren Gruppen wie Phosphat und Sulfat (Reske 1973, Choi and Meyer 1975).

Durch Elektrodialyse der ZW-Präparationen wurde aus dem Natrium-Salz der (wasserlöslichen) ZW die freie Säureform erhalten. In Übereinstimmung mit den Befunden von Galanos and Lüderitz (1975) zeigte sich auch am ZW-Polysaccharid die vergleichsweise gute Löslichkeit der freien Säure in organischen Lösungsmitteln im Gegensatz zu den Polysaccharid-Salzen. Rühren der ZW in DMSO bzw. kurzzeitige Inkubation des Gemisches im Ultraschallbad führte in der Regel zu einer vollständigen Lösung. Die in einigen Fällen erst nach Zugabe geringer Mengen von p-Toluolsulfonsäure beobachtete vollständige Lösung dürfte ebenfalls ihre Ursache in der Ansäuerung weiterer (durch die Elektrodialyse noch nicht quantitativ entsalzter) saurer Gruppen haben; eine Freisetzung von anorganischem Sulfat infolge der p-Toluolsulfonsäure-Zugabe konnte nicht festgestellt werden.

Aufgrund der Alkalistabilität der ZW-Sulfatestergruppen war eine Desulfatisierung durch die alkalischen Methylierungsbedingungen nicht zu befürchten.

Nach Methylierung der ZW konnte das Polymer durch Dialyse in H_2O quantitativ aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden. Die Möglichkeit, durch Gelfiltration mit Hilfe einer Sephadex LH-20-Säule mit Chloroform als Elutionsmittel eine schnelle Reinigung des permethylierten Polysaccharids zu erreichen, bewährte sich hier nicht: nur etwa 40 % der zur Methylierung eingesetzten Menge konnte als chloroformlösliche Fraktion wiedererhalten werden.

Die Kontrolle des Methylierungsgrades der isolierten ZW-Präparation durch IR-Spektroskopie zeigte eine drastisch gegenüber nativer ZW verringerte OH-Absorption im Bereich von $3400 - 3600\text{ cm}^{-1}$ (vgl. Abb.4). Durch Wiederholung der Methylierung konnte jedoch diese Absorptionsbande noch weiter reduziert werden. Verantwortlich für die verbleibende geringe OH-Absorption dürften Spuren von Feuchtigkeit sein, sowie ein gewisser Grad an "Untermethylierung", der sich bei sulfathaltigen Polysacchariden mit ihren extremen Ladungsverhältnissen wohl nicht vollständig vermeiden läßt; auch Nunn and Parolis (1970) stellten bei Methylierungsanalysen sulfatisierter Algenpolysaccharide selbst nach mehrfacher Methylierung eine Absorption im OH-Bereich fest.

Alle ZW-Präparationen wurden daher 2 x methyliert und anschließend unter Bedingungen hydrolysiert, die eine Spaltung der glycosidischen Bindungen erlauben, ohne daß dabei die N-Acetylsubstituenten der ZW-Aminozucker entfernt wurden (Acetolyse).

6.2. Gaschromatographische Analyse der partiell methylierten Alditolacetate

Zum gaschromatographischen Nachweis der Methylierungsprodukte wurden die nach Hydrolyse erhaltenen Monosaccharide durch Reduktion und anschließende Peracetylierung in die entsprechenden partiell methylierten Alditolacetate überführt.

Durch Verwendung von 2 inneren Standards (2.3.4.6-O-Methyl-Glucitol und 2.3-O-Methyl-Glucitol) mit definierten Retentionszeiten ($t_R = 1.00$ bzw. 5.39) war es möglich, die Retentionszeiten der im Gaschromatogramm erhaltenen Peaks mit den von

Björndal et al. (1970) publizierten Werten zu vergleichen. Nach einer zur Elution der Monomethyl-Hexosen ausreichenden Zeitspanne (32 min) wurde die Temperatur von 135°C auf 170°C gesteigert, so daß auch die Signale der schwerer flüchtigen partiell methylierten Alditolderivate von N-Acetylhexosaminen aufgenommen werden konnten.

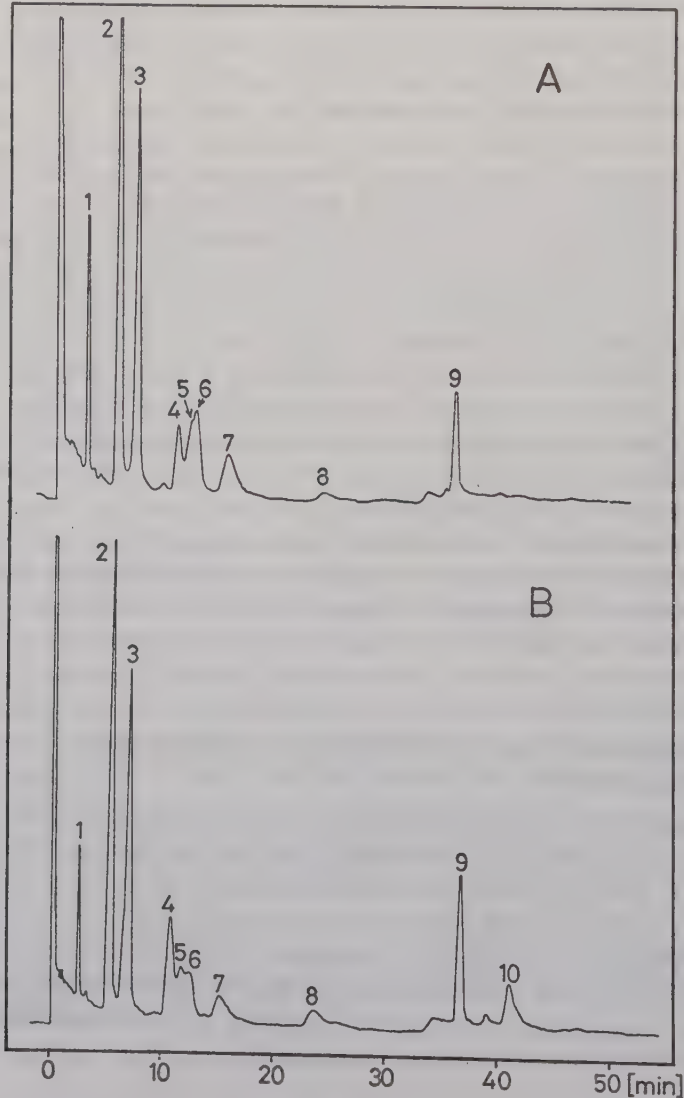


Abbildung 13:

Gaschromatogramme der partiell methylierten Alditolacetate, die nach Hydrolyse aus permethylierten (A) bzw. permethylierten carboxylreduzierten Zellwänden (B) erhalten wurden.

Wie der in Abbildung 13 wiedergegebene Vergleich der Gaschromatogramme von Hydrolysaten permethylierter unbehandelter ZW und Carboxyl-reduzierter ZW zeigt, wirkte sich die Reduktion der Uronsäuren einmal im Entstehen einer Schulter in Peak 3 und eines neuen Peaks 10 aus; zudem wurden die Intensitäten der Peak-Signale teilweise deutlich verändert. In ähnlicher Weise entsprachen der Abspaltung estergebundener Sulfatgruppen gut erkennbare Intensitäts-Ab- bzw. Zunahmen einzelner Peaks in den Gaschromatogrammen von Hydrolysaten desulfatisierter ZW-Präparationen.

Gaschromatogramme gleicher ZW-Präparationen, die unabhängig voneinander methyliert worden waren, zeigten in reproduzierbarer Weise eine Übereinstimmung ihres spezifischen Peakmusters; damit wurde gezeigt, daß die in den verschiedenen ZW-Präparationen (ZW unbehandelt, ZW desulfatisiert, ZW (Carboxyl-)reduziert, ZW reduziert/desulfatisiert) erhaltenen gaschromatographischen Signale in qualitativer wie auch in quantitativer Hinsicht für diese Präparation charakteristisch sind.

Zur Abschätzung der quantitativen Veränderungen wurden die Intensitäten der einzelnen gaschromatographischen Signale (Peaks) durch Berechnung der Peakflächen ermittelt. Um die verschiedenen ZW-Proben miteinander vergleichen zu können, sind in Tabelle 27 die daraus bestimmten relativen Signalintensitäten der erhaltenen Peaks mit ihren jeweiligen Retentionszeiten zusammengestellt.

Eine genauere Interpretation dieser Ergebnisse schien erst nach Identifizierung der durch diese Peaks repräsentierten ZW-Komponenten sinnvoll.

Tab.27: Relative Signalintensitäten und Retentionszeiten (t_R) der Peaks in Gaschromatogrammen permethylierter und anschließend hydrolysierter Zellwandpräparationen.

Peak-Nr.	t_R	Relative Intensität der Signale (%)			
		ZW unbehandelt	ZW desulfatisiert	ZW reduziert	ZW red/desulf.
1	1.00	6.4	5.1	4.7	4.1
2	1.8	37.0	37.8	28.7	32.9
3	2.3	22.2	33.1 ^a	24.3 ^a	35.5 ^a
4	3.5	6.7	4.1	10.8	4.9
5	3.8	5.2	4.5	5.9	1.9
6	4.0	7.4	2.2	4.8	0.7
7 ^a	4.9	5.9	3.6	4.0	2.0
8 ^a	6.9	1.4	1.0	2.1	2.0
9	(9.8) ^b	6.7	8.8	10.6	11.1
10	(10.9) ^b	-	-	4.2	4.7

^a Peak mit Schulter

^b t_R ist infolge der Temperatursteigerung auf 170°C nicht mit den übrigen Werten vergleichbar.

6.3. Massenspektrometrische Charakterisierung der partiell methylierten Alditolacetate

Durch die Arbeiten von Björndal et al. (1967, 1970) wurde die massenspektrometrische Analyse von partiell methylierten Alditolacetaten in Kombination mit Gaschromatographie (GC/MS) eine der wichtigsten Methoden zur Polysaccharid-Strukturaufklärung. Die gaschromatographisch getrennten Zuckerderivate werden dabei durch Ionisierung mit angeregten Elektronen in charakteristischer Weise fragmentiert; diese Fragmente werden in Abhängigkeit von ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/e) aufgetrennt und erscheinen als definierte Masselinien im Spektrum. Massenspektren unterscheiden daher zwischen Zuckern mit unterschiedlichem Methyl- bzw. Acetyl-Substitutionsmuster, nicht jedoch zwischen Stereoisomeren gleicher Methyl- bzw. Acetylsubstitution. Durch Spaltungen zwischen den C-Atomen der Alditolkette entstehen charakteristische Primärfragmente, die ihrerseits durch Ab-

spaltung kleinerer Bruchstücke (Formaldehyd, Methanol, Essigsäure) ebenfalls typische Sekundärfragmente ergeben.

Aufgrund der massenspektrometrischen Analyse konnten in den Gaschromatogrammen der verschiedenen ZW-Präparationen die in Tabelle 28 zusammengestellten Substitutionsmuster der ZW-Zucker charakterisiert werden.

Tab.28: Massenspektrometrische Charakterisierung der gaschromatographisch getrennten partiell methylierten Alditolacetate.

Peak-Nr.	Position der Substituenten		Zuckertyp
	O-Methyl	O-Acetyl	
1	2.3.4.6	1.5	Hexose
2	3.4.6	1.2.5	Hexose
3	2.3.6	1.4.5.	Hexose
4	2.6	1.3.4.5	Hexose
5	4.6	1.2.3.5	Hexose
6	3.6	1.2.4.5	Hexose
7	3.4	1.2.5.6	} Hexose
	2.4	1.3.5.6	
8	2	1.3.4.5.6	} Hexose
	3.4.6	1.(2). ^a ₅	
9	3.6	1.(2). ^a _{4.5}	Hexosamin
10	3.6	1.(2). ^a _{4.5}	Hexosamin

^a In Position 2 der Hexosamine befindet sich ein N-Acetyl-substituent.

Die Massenspektren der Peaks 7 und 8 bestätigten frühere Beobachtungen (Tab.27), daß hier 2 verschiedene, gaschromatographisch unvollständig aufgetrennte Zuckerkomponenten vorliegen. Im Gegensatz dazu bewiesen die Massenspektren des Peaks 3, daß die Schulterbildung auf eine Zuckerkomponente mit gleichem Substitutionsmuster wie im Hauptpeak zurückzuführen ist.

6.4. Identifizierung der partiell methylierten Alditolacetate

Aufgrund der gaschromatographischen Mobilität (t_R) und des charakteristischen Fragmentierungsmusters in der Massenspektrometrie ist in vielen Fällen eine eindeutige Identifizierung der partiell methylierten Alditolacetate möglich. Soweit authentische Standards dieser Zuckerderivate zur Verfügung stehen, bildet die Co-Gaschromatographie ein weiteres wichtiges analytisches Hilfsmittel, da die ermittelten Retentionszeiten oft nicht genau mit den in der Literatur angegebenen Werten übereinstimmen. Die Ursache dafür liegt wohl in erster Linie an Unterschieden zu den "Standard-Chromatographiebedingungen" wie z.B. Heiztemperatur der Säule, Alter der Säule etc.

Die mit GC/MS und zum Teil mit authentischen Proben identifizierten Methylzucker der Halococcus-ZW sind in Tabelle 29 zusammengefaßt.

Tab.29: Übersicht der identifizierten Alditolacetate aus permethylierten Zellwand-Präparationen. In Klammern: t_R -Werte nach Björndal et al. (1970).

Peak-Nr.	O-Methylsubstitution des ZW-Zuckers
1	2.3.4.6-Glucose/Mannose (1.00)
2	3.4.6-Mannose (1.95)/3.4.6-Glucose (1.98)
3	2.3.6-Glucose (2.50); Peak-Schulter: 2.3.6-Galactose (2.42)
4	2.6-Galactose (3.65)
5	4.6-Glucose (4.02)
6	3.6-Galactose (4.15)
7	3.4-Mannose (5.37)/3.4-Glucose (5.39) 2.4-Mannose (5.44)
8	2-Hexose (7.9/8.1); 3.4.6-Hexosamin
9	3.6-Glucosamin/Galactosamin (t_R identisch: Choi and Meyer 1975)
10	3.6-Gulosaminuronsäure

Infolge identischer oder sehr ähnlicher Retentionszeiten ließen sich in Fällen gleicher Methylsubstitution (Peak 1,2,7,9) keine eindeutigen Aussagen machen. Da Peak 10 nur bei Carboxyl-reduzierten ZW-Präparationen auftrat und massenspektrometrisch als 3.6-O-Methyl-Hexosamin charakterisiert werden konnte, entspricht dieses Signal der Gulosaminuronsäure. Die in Peak 8 gefundene Mischung aus Monomethyl-Hexose und Trimethyl-Hexosamin konnte nicht näher charakterisiert werden, da einmal die t_R -Werte aller 3 2-O-Methyl-Hexosen sehr ähnlich sind und für Aminohexosen keine vergleichbaren Literaturwerte zur Verfügung standen.

6.5. Aussagen zur Struktur und Sulfat-Substitution der Zellwand

Nach Identifizierung der partiell methylierten ZW-Zuckerkomponenten (Tab.29) war es möglich, durch Analyse ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung sowie der nach Desulfatisierung bzw. Carboxylreduktion auftretenden Veränderungen ein Bild der verschiedenen Zuckersubstitutionsmuster in der ZW zu erhalten. Mit Hilfe der aus Tabelle 27 entnommenen relativen Signalintensitäten konnten diese Veränderungen und Unterschiede annähernd quantitativ beurteilt werden. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, daß die für alle methylierten ZW-Zucker einheitlichen Hydrolysebedingungen sehr leicht zu Differenzen mit den in nativer ZW gefundenen quantitativen Verhältnissen führen können (vgl. die unterschiedlichen maximalen Freisetzungsbedingungen für Neutral- und Aminozucker-Monosaccharide; Bildung von hydrolysestabilen Oligosacchariden etc.).

Durch die Methylierungsanalyse der Halococcus-ZW wurde gezeigt, daß der größte Teil der Glucosereste ohne Sulfat-Substituenten in einer 1 → 4 glycosidischen Bindung vorliegt (Peak 3). Daneben spricht der Nachweis von Glucose mit freien OH-Gruppen in Position 4 und 6 (Peak 5) sowie möglicherweise von 3.4-O-Methyl-Glucose (Peak 7) dafür, daß dieser Zucker in geringerem Maße auch andere glycosidisch Substitutionsmuster haben kann. Diese Di-O-Methyl-Glucosen (im Falle von Peak 7 möglicherweise auch

Mannose) konnten auch an desulfatisierter ZW zum größten Teil nachgewiesen werden; sie scheinen deshalb ebenfalls keine Sulfat-Substituenten zu besitzen sondern stellen mehrfach glycosidisch substituierte ZW-Hexosen dar.

Die nach Glucose quantitativ größte Neutralzuckerkomponente der nativen ZW ist Mannose. Frühere Befunde (Oligosaccharid-analyse, Perjodatspaltung) unterstützen die Annahme, daß es sich bei der von Peak 2 repräsentierten, ebenfalls Sulfatester-freien Zuckerkomponente um Mannosemoleküle handelt, die 1 → 2 glycosidisch gebunden in der ZW vorliegen. Der kleine auch nach Desulfatisierung unverminderte Anteil an 2.4-O-Methyl-Mannose (Peak 7) weist - ähnlich wie bei Glucose - auf mehrfache glycosidische Substitution hin.

Die Galactosereste der ZW weisen im Gegensatz zu den beiden übrigen Neutralzuckern generell eine mehrfache Substitution auf: Tri-O-Methylderivate der Galactose konnten nicht nachgewiesen werden. Nach Desulfatisierung der ZW wurde ein deutlicher Rückgang der beiden in etwa gleicher Menge vorhandenen 2.6-O-Methyl- bzw. 3.6-O-Methylgalactose Peaks (Peak 4,6) unter gleichzeitiger Bildung von 2.3.6-O-Methylgalactose (Schulterausbildung in Peak 3) beobachtet. Diese Befunde sprechen für eine 1 → 4 glycosidische Bindung sowie für die Esterbindung der Sulfatgruppen an C-3 bzw. in größerem Ausmaße an C-2 der ZW-Galactosereste. Der auch nach Desulfatisierung noch vorhandene Anteil an 2.6-O-Methylgalactose hat sehr wahrscheinlich seine Ursache in einer mehrfachen glycosidischen Bindung dieser Moleküle.

Die Analyse der methylierten ZW-Zucker gab Anlaß zur Annahme einer verzweigt-kettigen Struktur des ZW-Polymers. Dafür sprechen nicht nur die erwähnten Hinweise auf mehrfach glycosidisch gebundene Zuckerreste (so z.B. auch der Nachweis von 2-O-Methyl-Hexose in Peak 8) sondern auch der Nachweis von Tetra-O-Methyl-Hexosen (Peak 1). Diese nur an C-1 gebundenen Glucose- oder Mannosereste stellen die nichtreduzierenden Enden von Polysaccharidketten dar. Die quantitative Ausgeglichenheit der Bilanz zwischen methylierten Glucose- und Mannoseresten, die den äquimolaren Verhältnissen der beiden Zucker in löslicher

ZW entsprechen würde (vgl.Tab.8) spricht für die Vermutung, daß Glucosemoleküle diese terminalen Glieder des ZW-Polysaccharids bilden.

Die glycosidische Bindung aller Aminosuckerkomponenten in der ZW entspricht übereinstimmend einer 1 → 4 Verknüpfung (Peak 9,10). Nach Desulfatisierung wurde in Peak 9 eine Zunahme der 3.6.-O-Methyl-Hexosamine von etwa 30 % festgestellt; dies könnte als Hinweis für eine Sulfatsubstitution der kleineren Aminosuckerkomponente, des Galactosamins gewertet werden.

Nach Überführung der ZW-Uronsäuren in die entsprechenden Neutralzucker durch Reduktion der C-6-Carboxylgruppe wurde die Bildung einer Schulter in Peak 3 beobachtet. Gleichzeitig erfolgte eine sehr gut erkennbare Verstärkung des Peaks 4, jedoch nicht von Peak 6 (vgl.Abb. 13 und Tab. 29). Nach Desulfatisierung der Carboxyl-reduzierten Probe ging die Intensität des Peaks 4 auf einen Wert zurück, der etwa dem von desulfatisierter nicht-reduzierter ZW entsprach; zugleich konnte eine noch stärkere Ausprägung der Schulter in Peak 3 beobachtet werden. Daraus läßt sich für die Galacturonsäure-Komponenten der ZW eine 1 → 4 glycosidische Bindung ableiten. Diese Uronsäurereste sind zum Teil nicht sulfatisiert; der übrige Teil ist an der Hydroxylgruppe von C-3 mit Sulfat verestert.

Ein weiteres auffallendes Merkmal carboxylreduzierter ZW war die gut erkennbare Zunahme von Peak 5 gegenüber Peak 6 im Vergleich zu nicht-reduzierter ZW (vgl. Abb.16). Nach Desulfatisierung dieser ZW-Präparation nahm die Intensität des Signals für 4.6-O-Methylglucose stark ab, während in demselben Maße eine Zunahme von Peak 2 registriert wurde. Da in der ZW von Halococcus keine Mannuronsäure nachgewiesen werden konnte, entspricht diese Intensitätszunahme der Bildung von 3.4.6-O-Methylglucose; infolge der nur geringen Unterschiede der t_R -Werte von 3.4.6-Mannose und 3.4.6-O-Methylglucose war keine Schulterbildung wie im Falle der Galactose zu erwarten (vgl. t_R -Werte in Tab.29). Das vorliegende Ergebnis spricht daher für eine 3-O-Sulfatsubstitution von 1 → 2 glycosidisch gebundenen Glucuronsäureresten.

Überraschend bei der quantitativen Analyse der Uronsäurekomponenten war der im Gegensatz zu den Verhältnissen in nativer ZW vergleichsweise geringe Anteil der von Glucuronsäureresten herrührenden Glucosekomponenten insbesondere in der sulfathaltigen ZW-Präparation. Unter Berücksichtigung früherer Untersuchungsergebnisse (Oligosaccharidanalyse, Perjodatspaltung), die auf einen sehr hohen Grad an Substitution der Uronsäuren mit Sulfatgruppen hinwiesen, könnte das Vorliegen von doppelt (an den OH-Gruppen von C-3 und C-4) sulfatisierten Glucuronsäureresten eine Erklärung dafür sein. Aufgrund der hohen Ladungsdichte solcher Zuckerreste wäre eine Untermethylierung, d.h. in diesem Falle das vollständige Fehlen eines Signals für 6-O-Methyl-Glucose durchaus denkbar; eine Behinderung der Methylierung aufgrund benachbarter Sulfatsubstituenten wurde mehrfach beschrieben (Bourne et al. 1970).

7. Zur anomeren Konfiguration der Zellwand-Zuckerkomponenten

Aufgrund der spezifischen Rotation $[\alpha]_D = + 48.8^\circ$ einer wässrigen Lösung der solubilisierten, N-acetylierten ZW, können für die Zuckerkomponenten sowohl α -, wie (in geringerem Maße) auch β -glycosidische Bindungen angenommen werden: während β -Anomere niedrige optische Drehwerte aufweisen, bewirken α -Bindungen im Allgemeinen eine hohe spezifische Rotation (Pazur 1970).

Im "fingerprint"-Bereich des IR-Spektrums konnten keine Signale gefunden werden, die Rückschlüsse auf die anomere Konfiguration der ZW-Komponenten erlaubt hätten. Über die Oligosaccharidanalyse war eine β -glycosidische Bindung der Glucuronsäurereste ermittelt worden (vgl. 4.4.1.). Von Hoffman et al. (1972) wurde eine Konfigurations-Bestimmungsmethode in Polysacchariden beschrieben, die auf der spezifischen Oxidierbarkeit β -glycosidisch gebundener Hexopyranosen mit Chromtrioxid beruht; die Vorbedingung dieses Verfahrens liegt in der quantitativen Peracetylierbarkeit des Polysaccharids, da Zuckerreste mit freien OH-Gruppen unabhängig von der anomeren Konfiguration oxidiert werden (Lindberg et al. 1975).

Trotz zweimaliger Peracetylierung der ZW-Präparation wurde mit Ausnahme der Gulosaminuronsäure bei allen übrigen ZW-Zuckern eine Abnahme um ca. 60 % nach CrO_3 -Behandlung festgestellt. Die Oxidation dürfte zum Teil durch unvollständige Peracetylierung bzw. durch freie OH-Gruppen infolge Desulfatierung (vgl. Oxidationsbedingungen !) bedingt sein. Aus dem Versuchsergebnis läßt sich daher für Gulosaminuronsäure eine α -glycosidische Bindung ableiten.

D. Diskussion

1. Zur chemischen Zusammensetzung der Halococcus-Zellwand

Die Untersuchungen der ZW von 3 Stämmen der Gattung Halococcus brachten übereinstimmende Ergebnisse in der chemischen Zusammensetzung. Der, bezogen auf das ZW-Trockengewicht, überwiegende Teil der ZW-Bausteine besteht aus Kohlenhydraten, deren einzelne Komponenten nur quantitative, nicht jedoch qualitative Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen aufwiesen. Bereits die ersten Versuche zur Identifizierung der ZW-Komponenten von extrem halophilen Kokken (Brown and Cho 1970) ließen eine Zusammensetzung dieses Kohlenhydratanteils aus 3 verschiedenen Kohlenhydratklassen, Neutralzuckern, Aminoszuckern und Uronsäuren erkennen.

Die quantitativ übereinstimmenden Resultate gaschromatographischer und enzymatischer Bestimmungsversuche zeigten, daß Glucose, Mannose und Galactose, die 3 Neutralzuckerkomponenten der ZW, der D-Reihe zuzuordnen sind. Im Gegensatz zu den Befunden von Brown and Cho (1970) konnten wir zeigen, daß diese Zucker in deutlich voneinander verschiedenen Mengen in der ZW vorliegen: D-Glucose bildet in der Regel die quantitativ größte Neutralzuckerkomponente (40-50 % der Gesamt-Neutralzucker), D-Galactose stellt den geringsten Anteil (ca. 25 %).

Glucosamin bildet in den von uns untersuchten Zellwänden die häufigste Aminoszuckerkomponente, hinter der die beiden anderen Hexosamine, Galactosamin und eine Hexosaminuronsäure quantitativ deutlich zurückbleiben. Auch von Reistad (1975) konnte bei Untersuchung der ninhydrin-positiven ZW-Komponenten einer Reihe von Stämmen bestätigt werden, daß Glucosamin in der Regel die Aminoszucker-Hauptkomponente darstellt. Neben Galactosamin weist die Halococcus-ZW eine weitere Aminoszuckerkomponente auf, die als Gulosaminuronsäure identifiziert werden konnte. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß diese von Reistad (1974, 1975) erstmals bei Halokokken gefundene Hexosaminuronsäure vorher nur als Antigen-Baustein eines halophilen Bakteriums, Vibrio

parahaemolyticus beschrieben worden war (Torii et al. 1973). Durch die Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten gelang es, erstmals quantitative Aussagen zum Vorkommen der Gulosaminuronsäure in der Halococcus-ZW zu machen: bei 2 der 3 untersuchten Stämme ist dieser Zucker die kleinste Aminozuckerkomponente; in der ZW des Stammes CCM 537, die einen bemerkenswert geringen Uronsäureanteil aufweist, bildet sie dagegen nach Glucosamin die quantitativ stärkste Hexosaminkomponente. Möglicherweise liegen die ermittelten Werte aufgrund der Hydrolyselabilität der (Amino-)Uronsäuren bei gleichzeitiger Stabilität ihrer glycosidischen Bindungen etwas zu niedrig. Die von Reistad (1975) diskutierte Zerstörungsrate der Gulosaminuronsäure von mehr als 50 % unter den üblichen Hydrolysebedingungen ist jedoch sicher zu hoch angesetzt: die Bestimmung des Gesamtaminozuckergehalts mit Hilfe der Elson-Morgan-Methode (nach ZW-Totalhydrolyse) und des Anhydrosucker-Tests (nach hydrolytischer De-N-Acetylierung, ohne daß die Aminozucker quantitativ als Monosaccharide vorlagen) erbrachte gleiche Resultate, so daß eine drastisch erhöhte Zerstörungsrate der Aminouronsäure bei hydrolytischer Spaltung der ZW in Monosaccharide sehr unwahrscheinlich erscheint.

Durch eine Reihe von Experimenten konnte gezeigt werden, daß die ZW-Aminozucker in N-acylierter Form vorliegen, also keine basischen Eigenschaften aufweisen. Wie bei den meisten der in der Natur vorkommenden Aminozucker bilden N-Acetylgruppen die Amino-Substituenten. Daß die entsprechende N-Acetylhexose nur im Falle des Glucosamins direkt chromatographisch nachgewiesen werden konnte, ist durch die unterschiedlichen Bindungsverhältnisse der Aminozucker im ZW-Polysaccharid bedingt: sowohl Galactosamin wie auch Gulosaminuronsäure bilden bei ZW-Hydrolyse sehr leicht hydrolysestabile Disaccharide (Aldobiuronsäuren), deren Zerlegung in Monosaccharide die hydrolytisch begünstigte De-N-Acetylierung vorausgeht. Glucosamin weist dagegen zum Teil andersgeartete Bindungsverhältnisse auf (vgl. Disaccharid $\text{GlcNH}_2 \rightarrow \text{Gal}$), die eine schnellere Freisetzung der Hexosamin-Monosaccharide in zum Teil noch N-acetylierter Form erlauben.

Daß auch die ZW-Uronsäuren heterogen zusammengesetzt sind, konnten wir durch den Nachweis von Galacturonsäure neben dem von Brown and Cho (1970) unter Vorbehalt als Glucuronsäure identifizierten Zucker zeigen. Wir fanden daß Glucuronsäure als Uronsäuren-Hauptkomponente in etwa doppelt so hoher Konzentration wie Galacturonsäure in der ZW vorliegt. Aufgrund der enzymatischen Nachweisbarkeit beider Uronsäuren als Neutralzucker nach Carboxylreduktion der ZW lassen sich diese sauren ZW-Zucker der D-Reihe zuordnen.

Die Beantwortung der Frage, warum selbst nach mehrfacher Reduktion der ZW-Carboxylgruppen stets weniger als 70 % des ursprünglich vorhandenen Uronsäuregehalts als Neutralzuckerzunahme gemessen wurde, muß offengehalten werden. Aufgrund verschiedenartiger Hydrolyseversuche an reduzierter ZW scheidet die Bildung hydrolyseresistenter Oligosaccharide als Erklärungsmöglichkeit weitgehend aus. Gaschromatographische Analysen schließen zudem die Bildung neutraler Zucker-Umbildungsprodukte (z.B. Anhydrohexosen) unter den alkalischen Reaktionsbedingungen aus. Eine Hinderung der Carboxylreduktion aus sterischen oder elektrostatischen Gründen scheint ebenso wenig vorzuliegen, da ja der Uronsäuregehalt bereits nach der 1. Reduktion um etwa 95 % zurückging. Möglicherweise spielt die für Carboxylsubstituierte Uronsäuren typische β -Eliminierung im Alkalischen eine Rolle (Lindberg et al. 1975). Die Behandlung der Carbodiimid-aktivierten ZW-Uronsäuren mit NaBH_4 schafft Bedingungen, unter denen eine teilweise β -Eliminierung von Uronosylresten durchaus denkbar wäre. Durch die darauffolgende Dialyse des Reduktionsgemisches würden diese unreduzierten, eliminierten Uronsäurereste entfernt werden, so daß im reduzierten Polymer zwar keine Uronsäuren mehr nachweisbar sind, die Neutralzuckerzunahme jedoch quantitativ hinter der Uronsäure-Abnahme zurückbleibt.

Im Gegensatz zu der weitgehend aus sauren Proteinen (75 %) und Lipiden aufgebauten Zellhülle der Halobakterien (Larsen 1973) finden sich in der starren ZW der Halokokken nur geringe Spuren von Protein (2 % des ZW-Trockengewichts) und Lipiden.

Das ebenfalls zum großen Teil aus sauren Aminosäureresten (Glutaminsäure, Asparaginsäure) zusammengesetzte Proteinmaterial der Roh-Zellwände ließ sich durch die Wirkung von Proteasen entfernen. Wie der mit dem Proteinverlust korrespondierende Verlust der ZW-Pigmentierung andeutete, sind diese Proteine (und Lipide) zu den Rest-Membranbestandteilen zu rechnen.

Glycin bildet die einzige durch Proteinasen nicht entfernbare Aminosäure der ZW. Bereits von Brown and Cho (1970) wurde auf den ungewöhnlich hohen Glycingehalt in Rohzellwänden extrem halophiler Kokken hingewiesen. Von Reistad (1975) konnte ebenfalls bei einer Reihe von Stämmen Glycin als einzige Aminosäurekomponente in durch tryptische Verdauung gereinigten Zellwänden nachgewiesen werden; in einigen wenigen Fällen wurde jedoch auch das Vorliegen von Glycin und Glutaminsäure in etwa äquimolaren Verhältnissen beobachtet. Hinweise auf die Lokalisation der Glycin-Moleküle im ZW-Polysaccharid wurden durch die Oligosaccharidanalyse nicht erhalten: in keinem Fall konnten wir eine quantitativ belegbare Relation zwischen der Aminosäure und einer der übrigen ZW-Komponenten feststellen. Die Ergebnisse der Dinitrophenylierung und Hydrazinolyse sprechen für eine nur geringe Anzahl freier Amino- und Carboxylgruppen von Glycin in der ZW. Ebenso kann die in vielen Fällen beobachtete Labilität der Glycin-Reste im Alkalischen als Hinweis für Peptidbindungen der Aminosäure gewertet werden (Archibald et al. 1970); es gelang jedoch nicht, in Partialhydrolysaten das Dipeptid Gly-Gly nachzuweisen.

Zu den auffallendsten Merkmalen der Halococcus-ZW gehört der ungewöhnlich hohe Gehalt an sauren anorganischen Bestandteilen, insbesondere an Sulfat. Der Anteil von Phosphat ist dazu zwar vergleichsweise gering, doch konnte durch Markierungsexperimente gezeigt werden, daß es sich dabei um einen echten, integralen Bestandteil der ZW handelt. Nähere Untersuchungen zur Rolle dieser Komponente im ZW-Polysaccharid wurden nicht durchgeführt, da sich bei ZW-Fraktionierungsversuchen zeigte, daß die relativ geringen Phosphatmengen nicht spezifisch einer bestimmten ZW-Fraktion zugeordnet werden konnten.

2. Die Halococcus-Zellwand: Ein sulfatisiertes Heteropolysaccharid

Alle Versuche, aus nativer ZW mit alkalischen oder sauren Extraktionsverfahren einzelne Polymere herauszulösen, brachten keinen Hinweis auf das Vorliegen mehrerer Homo- oder Heteropolysaccharide im ZW-Verbund. Sowohl in den Extrakten wie dem unlöslichen Rückstand konnten zumindest qualitativ dieselben Zuckerkomponenten nachgewiesen werden. Während im ungelösten Extraktionsrückstand der größte Teil der ZW-Bestandteile in einer der nativen ZW sehr ähnlichen Zusammensetzung gefunden wurde, zeigte die kleine, in der Größenordnung von 10 % des Ausgangs-ZW-Materials, extrahierte polymere Fraktion meist einen deutlich erhöhten Anteil an Galactosamin, Uronsäuren und Mannose. Qualitativ ähnliche Beobachtungen konnten wir auch an niedermolekularen Fraktionen saurer ZW-Partialhydrolysen machen; es liegt daher der Gedanke nahe, daß die im Säuren extrahierten Kohlenhydrate Partialhydrolyseprodukte darstellen, deren Zusammensetzung von der Festigkeit bzw. Labilität bestimmter glycosidischer Bindungen und struktureller Gegebenheiten des Polysaccharids bestimmt ist. In dieser Weise dürften auch die von Reistad (1975) erhaltenen Ergebnisse von TES-Extraktionen verschiedener Halococcus-Zellwände bewertet werden: Unter wesentlich drastischeren als den von uns verwendeten Bedingungen (10 % TES, 60°C, 6 h) konnten zwischen 12 und 75 % und in 2 Fällen sogar alle Galactosamin-Komponenten aus der ZW extrahiert werden.

Obwohl mit Hilfe von HF die Phosphatesterbindungen in der ZW weitgehend gelöst wurden, ergaben sich keine Hinweise auf ZW-Polysaccharidkomplexe, die ähnlich dem Peptidoglycan-Teichonsäure-Komplex bei Grampositiven durch Phosphodiesterbindungen kovalent miteinander verbunden sind. In guter Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen sind auch frühere Befunde von Reistad (1972) bezüglich der Verteilung ninhydrin-positiver ZW-Komponenten nach ZW-Behandlung mit Formamid (20 min, 170°C) und anschließender Fraktionierung der löslichen polymeren Produkte über DEAE-Sephadex: während bei Zellwänden grampositiver

Bakterien diese Behandlung zu einer Abspaltung von Kohlenhydraten vom unlöslichen Peptidoglycan führt (Krause and McCarty 1961), wurde die Halokokken-ZW vollständig solubilisiert. Die bei Elution von DEAE-Sephadex erhaltenen Fraktionen unterschieden sich jedoch nur geringfügig in ihrer Hexosamin-Zusammensetzung.

Der erfolglose Versuch, unter Einwirkung von Endoglycosidasen oder mehreren Exoglycosidasen ZW-Fragmente zu erhalten, kann als Hinweis für sterische Hinderung und/oder als weitere Bestätigung dafür gewertet werden, daß der ZW-Komplex sehr heterogen, d.h. ohne größere Homoglycan-Sequenzen zusammengesetzt ist.

Die Fraktionierungsversuche an löslichem ZW-Material sprechen dafür, daß die Komponenten der Halococcus-ZW ein Heteropolysaccharid bilden. Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie an Ecteola-Cellulose erlaubten eine Charakterisierung der ZW-Präparation als hochmolekulares saures Polysaccharid, in das alle Komponenten der ZW integriert sind. Das Ergebnis der oben beschriebenen Fraktionierungsversuche von Reistad (1972) entspricht voll diesen Befunden. Daß diese Aussage für jede der ZW-Komponenten in gleicher Weise zutrifft, konnten wir anhand der ZW-Fraktionierungen mit quaternären Ammoniumsalzen zeigen: durch die Fällbarkeit des gesamten ZW-Materials mit CTAB wurde der anionische Charakter des Gesamt-Polysaccharids unterstrichen. Etwa 90 % einer jeden ZW-Komponente konnten in der zwischen >0.4 m und ≤ 0.9 m KCl löslichen Fraktion des CTAB-ZW-Komplexes nachgewiesen werden. Da selbst die geringen Polysaccharidmengen, die nicht dieser Hauptfraktion zugehören, keine Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung aufwiesen, darf das Versuchsergebnis als Beweis der Heteroglycan-Natur der Halococcus-ZW angesehen werden. Auch von anderen Autoren (Percival 1968, Aspinall 1970) wurden die angegebenen Kriterien (einheitliches Verhalten bei Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und anderen Fraktionierungsmethoden) als hinreichende Beweise für die Charakterisierung eines Polysaccharids als Heteroglycan gewertet.

Die Unlöslichkeit des CTAB-ZW-Komplexes in Salzkonzentrationen von 0.4 m KCl beweist, daß der anionische Charakter des ZW-Polymers nicht allein durch den Uronsäureanteil erklärbar ist. Carboxylsaure Polyanionen wie Pectin, Hyaluronsäure oder Algininsäure bilden unter diesen Bedingungen keine Komplexe mit CTAB mehr (Scott 1965); auch für Phosphat-haltige Polyanionen wie DNA liegt die kritische, zur Lösung des CTAB-Polyanion-Komplexes erforderliche Salzkonzentration bereits bei 0.36 m KCl. Weiterhin konnten wir zeigen, daß bei pH 1.8 eine Komplexbildung der ZW mit CTAB in derselben Größenordnung erfolgt wie im Neutralen, obwohl Uronsäuren unter diesen Bedingungen keine negativen Ladungen tragen. Daraus wurde erkennbar, daß alle ZW-Komponenten in einem Polysaccharid gebunden sind, dessen stark saurer Charakter weder durch Uronsäuren noch durch Phosphat bedingt sein kann. Für eine Bindung von Sulfat als wichtigster anionischer Gruppe der ZW sprachen nicht nur der hohe Gehalt sowie die Unausgeglichenheit der Ladungsbilanz bei der ZW-Aschenanalyse, sondern vor allem die Feststellung, daß die Sulfatgruppen erst unter sauren Hydrolysebedingungen einer definierten Kinetik folgend freigesetzt wurden. Mit einer kritischen Salzkonzentration von etwa 0.8 m KCl zur Lösung des CTAB-ZW-Komplexes liegt das ZW-Polyanion in der für sulfatisierte Mucopolysaccharide charakteristischen Größenordnung. Der direkte Beweis für das Vorliegen der Sulfatgruppen als estergebundene ZW-Substituenten wurde durch den Nachweis spezifischer Signale im IR-Spektrum des Polysaccharids erbracht.

Durch die bei der Oligosaccharidanalyse untersuchten und charakterisierten ZW-Fragmente einfacher und komplexerer Zusammensetzung war es möglich, eine kovalente Verknüpfung aller ZW-Komponenten direkt zu zeigen: für jede Kombination von Neutralzuckern, Aminoazuckern und Uronsäuren der ZW konnten geeignete Oligosaccharide isoliert werden, die zum Teil noch sulfatiert waren. Diese Befunde erlauben eine Charakterisierung der Halococcus-ZW als sulfatisiertes Heteropolysaccharid.

Aufgrund seiner Zusammensetzung aus 8 verschiedenen Monosaccharidbausteinen gehört die ZW von Halococcus mit zu den komplexesten, bisher beschriebenen Strukturpolysacchariden.

In der Regel werden in einem Heteropolysaccharid nicht mehr als 5-6 verschiedene Zuckerkomponenten gefunden (Danishefsky et al.1970).

3. Glycosidische Bindungen und Sulfatsubstituenten im Zellwand-Polysaccharid

Nach der Charakterisierung der ZW als sulfatisiertes Heteroglycan schien uns die Lokalisierung der Sulfatestergruppen von besonderem Interesse zu sein. Sulfatisierte Polysaccharide wurden bisher in nur sehr beschränktem Umfang in der Natur gefunden, so daß über die Sulfatsubstituenten die Herstellung struktureller und funktioneller Beziehungen zu Polysacchariden anderer Organismen denkbar ist. Mit Hilfe der zur Klärung dieser Frage verwendeten Methoden (Oligosaccharidanalyse, Perjodatoxidation, Methylierungsanalyse) war es zudem möglich, größtenteils die glycosidischen Bindungsverhältnisse bei den verschiedenen Zuckerkomponenten des ZW-Polymers aufzuklären.

Die hohe Hydrolyselabilität der ZW-Sulfatgruppen - eine typische durch die Position der Sulfatesterbindungen bedingte Eigenschaft (s.unten) - erlaubte zur Gewinnung sulfathaltiger ZW-Fragmente nur sehr milde Hydrolysebedingungen. Nur ein kleiner Teil des ZW-Materials konnte daher in Form niedermolekularer, mehr oder weniger komplexer Oligosaccharide (sulfatisierte Monosaccharide konnten nicht isoliert werden) weiter untersucht werden, während die Hauptmenge in Form hochmolekularer Anteile im Dialysierschlauch zurückblieb.

Mit Hilfe verschiedener Fraktionierungs- und Isolierungsmethoden konnten wir zwischen den einzelnen ZW-Zuckern klare Unterschiede bezüglich ihres elektronegativen Verhaltens feststellen. Obwohl in allen isolierten Oligosacchariden - bedingt durch die kovalente Bindung in einem Polymer - mehrere verschiedene ZW-Zucker gefunden wurden, erlaubte bereits die Anreicherung bestimmter Zuckerreste in ungeladenen bzw. anionischen Fraktionen Rückschlüsse auf die Möglichkeit einer Sulfatsubstitution. Insbesondere die Uronsäuren konnten stets in den Fraktionen negativer Ladung angereichert werden, obwohl die Carboxylgruppen dieser Zucker unter den Oligosaccharid-Isolierungsbedingungen undisso-

ziiert vorliegen; umgekehrt fanden sich Glucose und Glucosamin vorzugsweise in den ungeladenen Oligosaccharidfraktionen.

Nach Isolierung gereinigter Oligosaccharide aus anionischen Elektrophorese-Fractionen konnten sulfatesterhaltige ZW-Fragmente in 2 Gruppen eingeteilt werden: i) Einfache, aus Neutralzuckern aufgebaute Oligosaccharide; die Zuckerhauptkomponente bildete jeweils Galactose. Die quantitative Bestimmung des estergebundenen Sulfats ergab äquimolare Mengen zum Galactosegehalt. ii) Komplexere Oligosaccharide, die Uronsäuren als Hauptkomponente, Galactosamin als Aminozyuckerkomponente, Mannose, Galactose und in deutlich geringeren Mengen Glucose und Glucosamin enthielten.

Insbesondere bei diesen größeren ZW-Fragmenten stellen die ermittelten Sulfatestertermengen nur Minimalwerte dar; wie der chemische Aufbau solcher Oligosaccharide zeigte, scheinen bestimmte glycosidische Bindungen, vor allem Bindungen mit Uronsäuren, unter den gewählten Hydrolysebedingungen so stabil zu sein, daß die Fragmentierung in Oligosaccharide von einer teilweisen Desulfatisierung begleitet wird. Das im Vergleich dazu gut übereinstimmende molare Verhältnis zwischen Galactose- und Sulfatestergehalt in den einfacheren Oligosacchariden ist wohl in erster Linie durch die in vielen Versuchen festgestellte Hydrolyselabilität der galactosidischen Bindungen bedingt.

Im Gegensatz zur sauren Partialhydrolyse erlaubte die desaminative Spaltung der ZW neben dem Nachweis Galactosesulfat-haltiger Oligosaccharide auch in den komplexeren Fragmenten die Erstellung einer quantitativen Beziehung von Sulfatester- und Uronsäuregehalt. Die auffällige Anreicherung Glucose-haltiger Oligosaccharide in elektrophoretisch immobilisierbaren ZW-Fractionen bestätigte ebenso wie analoge Ergebnisse für die Aminozyuckerkomponente Glucosamin bzw. ihr Desaminierungsprodukt Anhydromannose die früheren Aussagen, daß diese Komponenten für eine Sulfat-Substitution in größerem Maße nicht in Frage kommen. Darüberhinaus führte jedoch der Vergleich von Uronsäure- und Galactosegehalt mit der Menge an estergebundenem Sulfat in der Regel zu einem "Sulfat-Überschuß" in der Größenordnung von

10 - 40 %; zugleich konnten in kleinerem Umfang auch Oligosaccharide isoliert werden, die trotz ihres Uronsäure- und Galactosegehalts nicht sulfatisiert waren. Quantitative Überlegungen führten deshalb zu dem Schluß, daß eine zum Teil mehrfache Sulfatsubstitution von ZW-Zuckern und/oder das Vorliegen weiterer sulfatisierter Zuckerkomponenten angenommen werden muß.

Eine relativ genaue Spezifizierung der Hydroxylpositionen, die zur Bindung von Sulfatgruppen in ZW-Zuckern in Frage kommen, erlaubten bereits die Ergebnisse der Sulfatester-Hydrolysekinetik sowie spezifische Signale des IR-Spektrums. Mit beiden Methoden wurde übereinstimmend die Lokalisierung der Sulfatgruppen in äquatorialer Position an sekundären Hydroxylgruppen festgestellt. Da die in der ZW vorhandenen Zuckerkomponenten in der Regel die energetisch bevorzugte C 1-Konformation (Angyal 1972) aufweisen, in der bei D-gluco-Konfiguration alle Hydroxylgruppen äquatoriale Positionen einnehmen, kommen für die Sulfatestergruppen der ZW-Zucker nur wenige Möglichkeiten der Hydroxylsubstitution in Betracht (Abb.14).

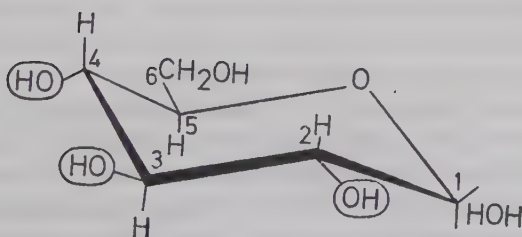


Abbildung 14:

D-gluco-Hexose in der energetisch bevorzugten C-1-Konformation. Die markierten Hydroxylgruppen kommen für eine O-Sulfatsubstitution in Frage.

Für ZW-Zuckerreste mit D-gluco-Konfiguration (D-Glc, D-GlcUA) sind deshalb die Hydroxylpositionen 2,3 und 4 (bei Aminozuckern scheidet Position 2 aus) für eine Sulfatesterbindung möglich. Die D-galacto-Konfiguration (D-Gal, D-GalUA) schließt folglich die OH-Position 4, D-manno-Konfiguration Position 2 von einer solchen Substitution aus, da diese Epimere in den genannten Positionen axiale Hydroxylgruppen aufweisen.

Aus den Polyol-Abbauprodukten des Smith-Abbaus konnte für die Mannosereste der ZW eine $1 \rightarrow 6$ oder $1 \rightarrow 2$ glycosidische Bindung abgeleitet werden. Nur im Falle einer glycosidischen Substitution in Position 6 war daher für diesen Neutralzucker eine Sulfatsubstitution denkbar, da an unbehandelter ZW 75 % der Mannosereste mit Perjodat oxidierbar waren. Die Methylierungsanalyse bestätigte die größtenteils $1 \rightarrow 2$ glycosidische Verknüpfung der Mannosereste und schloß durch den Nachweis von über 90 % der partiell methylierten Mannosereste als 3.4.6-Trimethyl-Mannose eine Sulfatsubstitution aus.

Glucose war durch die Oligosaccharidanalyse als nicht-sulfatisierte und durch Smith-Abbau als $1 \rightarrow 4$ glycosidisch gebundene ZW-Komponente charakterisiert worden. Trotzdem ließen sich durch Perjodatoxidation nur etwa 30 % der Glucosemoleküle zerstören. Der Vergleich der Glucose-Oxidationsraten in höhermolekularen ZW-Fragmenten mit hohem bzw. sehr niedrigen Uronsäuregehalt erbrachte den deutlichen Hinweis für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Uronsäuregehalt einer Probe und "Unteroxidation" aufgrund von Hemiacetalbindungen. Erklärbar wird diese Beobachtung dadurch, daß im Gegensatz zu oxidierten Neutralzuckern die durch Perjodatoxidation erhaltenen Aldehydgruppen von Uronosylresten keine intramolekularen Hemiacetalbindungen ausbilden können (da keine C-6-OH-Gruppen vorhanden), so daß intermolekulare halbacetalische Querverbindungen zu Hydroxylgruppen benachbarter Polysaccharidketten die weitere Oxidation hemmen (Ishak and Painter 1974). Durch die Methylierungsanalyse wurden unsere früheren Aussagen zur Bindung und Substitution der Glucosemoleküle im ZW-Polymer bestätigt: der weitaus größte Teil dieser Zuckerreste liegt $1 \rightarrow 4$ gebunden ohne Sulfatsubstituenten vor. Ein kleiner, jedoch signifikanter Anteil an 4.6-O-Methylglucose, der durch Desulfatisierung der ZW nicht wesentlich verändert wurde, beweist aber,

daß Glucose auch an Verzweigungen von Kohlenhydratketten teilnimmt. Aus diesen Zuckerresten setzt sich daher wohl auch der kleine, auch nach Desulfatisierung und Reduktion (Lösung von Hemiacetalbindungen) nicht oxidierbare Glucose-Anteil zusammen.

Die hohe Perjodatstabilität der Galactosereste und ihre drastisch erhöhte Oxidierbarkeit nach ZW-Desulfatisierung unterstrichen die Aussagen der Oligosaccharidanalyse bezüglich der Sulfatsubstitution dieses Zuckers. Wie die bei Smith-Abbau der ZW gefundene Threose andeutete, liegen die Galactosemoleküle zum größten Teil in 1 $\rightarrow$ 4 glycosidischer Bindung vor und sind - wie die Methylierungsanalyse zeigte - in der Hydroxylposition 2, in geringerem Maße in Position 3 mit Sulfat verestert. In guter quantitativer Übereinstimmung mit dem auch nach Desulfatisierung und Reduktion nicht Perjodat-oxidierbaren Galactoseanteil bewies die Methylierungsanalyse, daß etwa 1/3 der Galactosemoleküle neben der 1 $\rightarrow$ 4 Verknüpfung noch eine weitere glycosidische Bindung in Position 3 (ohne Sulfatsubstituenten) aufweisen; dies stimmt ebenfalls gut mit dem Nachweis nicht-sulfatisierter Galactose-haltiger Oligosaccharide überein.

Die Bindungsanalyse der ZW-Aminozucker zeigte in eindrucksvoller Weise, daß unabhängig voneinander mit Hilfe verschiedener Methoden übereinstimmende Aussagen erzielt werden konnten. Anhand Aminozucker-haltiger Aldobiuronsäuren konnte ebenso wie mit vergleichenden Oxidationsstudien (an unbehandelter bzw. de-N-acetylierter ZW) eine 1 $\rightarrow$ 4 glycosidische Bindung von Glucosamin- und Galactosaminresten gezeigt werden: die Untersuchung methylierter Zellwände erlaubte eine Erweiterung dieser Aussage auf alle 3 in der ZW vorhandenen Aminozucker.

Hinweise für eine Sulfatsubstitution des Galactosamins erhielten wir in vielen Versuchen: Die vergleichsweise niedrige De-N-Acetylierungsrate von Galactosamin unter alkalischen Bedingungen spricht für einen Substituenten in Position 3 (Lindberg et al. 1975); glycosidisch ist jedoch nur die C-4-OH-Gruppe substituiert, so daß daraus auf einen alkali-

stabilen nicht-glycosidischen Substituenten des Galactosamins geschlossen werden kann. Die auffallende Perjodatresistenz dieses Hexosamins im Vergleich zu Glucosamin und Gulosaminuronsäure in de-N-acetylierter ZW bzw. seine Oxidierbarkeit nach ZW-Desulfatisierung spricht weiterhin für eine Sulfat-substitution. Quantitative Vergleiche von Sulfatgehalt und Uronsäure-/Galactosamingehalt (Galactose spielt hier eine geringere Rolle) in Oligosacchariden entsprachen ebenfalls dieser Vorstellung. Trotzdem wir bei der Methylierungsanalyse kein 6-O-Methylhexosamin nachweisen konnten, glauben wir, daß die nach Desulfatisierung der ZW beobachtete Zunahme von 3,6-O-Methyl-N-Acetylhexosamin in einer dem Galactosamingehalt der ZW entsprechenden Größenordnung als weiteres Indiz für Galactosamin-3-Sulfat-Reste in der ZW gewertet werden kann. Diese Befunde sprechen zudem dafür, daß Galactosamin in der D-Konfiguration vorliegt, da nur die sekundäre OH-Gruppe in C-3 von D-Galactosamin eine äquatoriale Position aufweist.

Die Uronsäuren waren bereits anhand der Oligosaccharidanalyse als Schwerpunkt des negativen Ladungspotentials der Halococcus-ZW erkannt worden. Nach Desulfatisierung der ZW konnte deshalb auch erwartungsgemäß eine starke Zunahme der Perjodat-Oxidierbarkeit der Uronosylreste festgestellt werden, obwohl noch erhebliche Mengen dieser Zucker (37 %) auch nach Reduktion des Oxopolysaccharids nicht oxidierbar waren. Eine Erklärung für die Perjodat-Stabilität dieser Uronsäuren wurde durch die Bindungsanalyse nicht erhalten (s. unten); bei Uronsäurekomponenten können jedoch verschiedene Ursachen wie z.B. Konformation, cis-/trans-Stellung vicinaler OH-Gruppen und H-Brückenbindungen eine Rolle spielen (Fransson 1974). Auch bei anderen Uronosyl-Polysacchariden wie Algininsäure und Hyaluronsäure wurde eine bindungsanalytisch nicht begründbare Perjodastabilität von Uronsäureresten gefunden (Percival 1970, Jeanloz 1970).

Mit Hilfe der Methylierungsanalyse konnte für Galacturonsäure eine 1 → 4 glycosidische Bindung mit einer teilweisen Sulfat-substitution in der OH-Position 3 gezeigt werden. Nachdem in - wenn auch geringem Maße - Uronsäure-haltige sulfatfreie

Oligosaccharide aus ZW-Bruchstücken isoliert werden konnten und auch in nativer ZW etwa 20 % der Uronsäuren Perjodat-labil sind, entsprechen diese sulfatfreien oxidierbaren Uronosylreste mit großer Wahrscheinlichkeit dem unsubstituierten Galacturonsäure-Anteil des ZW-Polysaccharids.

Im Gegensatz zur Galacturonsäure spricht die Methylierungsanalyse für eine 1 $\rightarrow$ 2 glycosidische Bindung der Glucuronsäure und Sulfatsubstituenten in Hydroxylposition 3; sulfatfreie Glucuronosylreste scheinen nicht vorzuliegen. Bei Vergleich der Signalintensitäten der ZW-Methylierungsprodukte liegen die Werte für Glucuronsäure unter denen für Galacturonsäure. Dieses, der tatsächlichen Relation in der ZW nicht entsprechende Uronsäure-Verhältnis, ist möglicherweise durch eine doppelte Sulfatisierung (in OH-Position 3 und 4) eines Teils der Glucuronsäurereste und einer daraus resultierenden Untermethylierung bedingt.

Trotz der hohen Komplexität in ihrer chemischen Zusammensetzung ist die Halococcus-ZW durch relativ wenige Bindungs- und Substitutionstypen ausgezeichnet. Die vorherrschende glycosidische Bindung ist die 1 $\rightarrow$ 4 Verknüpfung, die wir für Glucose, Galactose, Galacturonsäure und sämtliche Aminozuckerkomponenten zeigen konnten. Mannose und Glucuronsäure sind die 1 $\rightarrow$ 2 glycosidisch gebundenen ZW-Zucker. Die Verzweigungen der Polysaccharidketten setzen an der C-3-OH-Gruppe eines Teils der Galactose- und Glucosereste an; in geringen Mengen kommen jedoch anscheinend auch 6-O-glycosidische Verzweigungen von Mannose und/oder Glucose vor. Die Esterbindungen der Sulfatsubstituenten sind übereinstimmend an sekundären äquatorialen Hydroxylpositionen (C-2 und C-3; bei Glucuronsäure möglicherweise auch C-4) der meisten Uronsäure-, Galactose- und Galactosaminreste lokalisiert. Aufgrund der exponierten sterischen Lage dieser Hydroxylgruppen (vgl. Abb. 14) wäre ein Sulfatisierungsmechanismus des ZW-Polysaccharids denkbar, der - entsprechend der biosynthetischen Reihenfolge bei sulfatisierten Mucopolysacchariden (Stoolmiller and Dorfman 1969) - den nachträglichen Transfer von Sulfat auf bereits synthetisierte ZW-Polymere bewirkt.

4. Zur Struktur der Halococcus-Zellwand

Aussagen zur Struktur eines Polysaccharids sind größtenteils von den Ergebnissen der Oligosaccharidanalyse abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurde das Augenmerk vornehmlich auf die Isolierung sulfatisierter Oligosaccharide gelegt, so daß daher sicher ein Teil von zur Strukturbestimmung des Polymers wichtigen ZW-Fragmenten übergangen und nicht näher untersucht wurde. Ebenso wie bei den Untersuchungen der meisten Algenpolysaccharide komplexerer Zusammensetzung (Percival 1970) lieferten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deshalb eine unvollständige Auswahl struktureller Details der ZW, so daß die Ableitung der chemischen Struktur des Gesamt-Polymers aus den erhaltenen experimentellen Resultaten zumindest teilweise spekulativen Charakter haben muß.

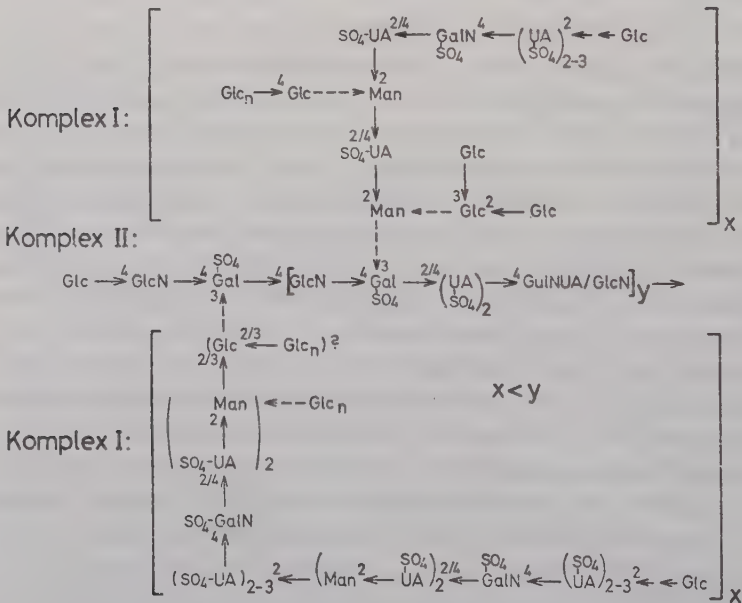


Abbildung 15:

Vorschlag einer möglichen strukturellen Organisation der Zuckerbauelemente im Heteropolysaccharid der Halococcus-Zellwand (die Pfeilrichtung kennzeichnet die vom reduzierenden Ende des Zuckers ausgehende glycosidische Verknüpfung mit der angegebenen OH-Position der benachbarten Zuckerkomponente).

Einen der wichtigsten, durch die Fragmentierungsversuche immer wieder bestätigten Beweise enger struktureller Beziehungen stellt das regelmäßige gemeinsame Vorkommen bestimmter Zuckerkomponenten in Hydrolysefraktionen und ZW-Extrakten dar. So wurde bereits frühzeitig aus diesen Versuchen das Vorliegen von unterschiedlich zusammengesetzten und wohl auch unterschiedlich lokalisierten Strukturbereichen im ZW-Polymer angedeutet. Wir bezeichnen die beiden auf diese Weise erhaltenen Strukturbereiche als Komplex I, bestehend aus Uronsäuren, Galactosamin und Mannose, und als Komplex II, der aus Glucosamin, Gulosaminuronsäure und Galactose als typischen Komponenten zusammengesetzt ist. Glucose und Uronsäuren scheinen eine intermediäre Stellung einzunehmen. Wie die Oligosaccharidanalysen beweisen, sind jedoch die Komponenten dieser Strukturbereiche durch kovalente Bindungen miteinander verbunden und ergeben damit das ZW-Heteroglycan.

Durch Behandlung der ZW mit Säure (Extraktionen, Partialhydrolyse) wurden vorzugsweise zum Komplex I gehörende Strukturen in Form polymerer oder dialysierbarer, komplex zusammengesetzter Oligosaccharide aus dem ZW-Polysaccharid gelöst.

Partialhydrolysebedingungen, die bei sulfatisierten Algenpolysacchariden zur Isolierung eines polymeren Uronsäurehaltigen Glycan-Rückgrates und niedermolekularer Fragmente der Polysaccharid-Seitenketten führten (Abdel-Fattah et al. 1974), ergaben bei entsprechender ZW-Behandlung ein lösliches, aus allen ZW-Komponenten in stöchiometrischen Verhältnissen zusammengesetztes Polymer. Dies zeigt deutlich, daß die Vorstellung eines durch Uronosylbindungen stabilisierten (Aldobiuronsäuren !) Polysaccharid-Rückgrates mit relativ hydrolyse-labilen Neutralzucker-Seitenketten für die ZW nicht zutrifft. Trotzdem ein einfaches Strukturschema mit Hilfe der vorgeschlagenen Strukturbereiche (aufgrund des stabilisierenden Elements der Uronsäuren in beiden Komplexen) nicht möglich ist, glauben wir dennoch, daß das unterschiedliche Extraktions- und Hydrolyseverhalten der beiden Komplexe durch ihre Lage im Polymer mitbedingt ist: Polysaccharide mit mehr als 2 ver-

schiedenen Zuckerkomponenten in einem Polymer haben gewöhnlich eine sehr verzweigte Struktur (Danishefky et al. 1970); auch für die Halococcus-ZW existieren ausreichende Beweise für die Annahme eines verzweigt-kettigen Polysaccharids, so daß die relativ einfache Extrahierbarkeit der zu Komplex I gehörenden Komponenten durch ihre periphere Lage im ZW-Polymer bedingt sein dürfte. Einer solchen Annahme entspricht auch die hohe Perjodatlabilität der ZW-Mannosereste: Zuckerkomponenten, die in auffallend hohen Anteilen durch Perjodat oxidierbar sind, liegen in einer komplexen Polysaccharidstruktur gewöhnlich an der Peripherie des Makromoleküls (Percival 1968, Bourne et al. 1970).

Die Komponenten des Komplexes II sollten dementsprechend vorzugsweise im Inneren des ZW-Polymers lokalisiert sein. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fand auch Reistad (1975) bei Bestimmung der ninhydrin-positiven Komponenten von polymeren TES-Extraktionsrückständen der ZW, daß Glucosamin und Gulosaminuronsäure, also typische Komponenten von Komplex II, weitgehend in polymerer Form gebunden bleiben.

Die Oligosaccharidanalyse erlaubte, die zweifellos sehr vereinfachende Aufgliederung der ZW in verschiedene Strukturbereiche etwas näher zu detaillieren. Durch die spezifische desaminative Spaltung wird das Polymer der Halococcus-ZW in hochmolekulare Bruchstücke mit Galactosamin und Mannose als typischen Komponenten, und kleinere Fragmente mit Glucosamin und Galactose als charakteristischen Bausteinen zerlegt. Uronsäuren und Glucose finden sich zwar in beiden Fragment-Typen, doch ist ihr Anteil in Großfragmenten wesentlich höher.

Auch die nach Partialhydrolyse erhaltenen größeren und entsprechend komplexeren ZW-Oligosaccharide bestätigen die Beobachtung, daß Galactosamin zusammen mit Uronsäuren und Mannose Zuckersequenzen bildet, deren Hydrolysestabilität wohl primär durch die Uronosylreste bedingt ist. Wie die Isolierung der Aldobiuronsäure GlcUA $\xrightarrow{\beta 1,4}$ GalN zeigte, finden sich im Komplex I der ZW Mucopolysaccharid-ähnliche Strukturdetails; mit Ausnahme der Hexosamin-Bindungsposition entspricht dieses Disaccharid vollständig Chondrosin, dem Haupthydrolyseprodukt von Chondroitinsulfat (Jeanloz 1970). Daß jedoch keine näheren

strukturellen Ähnlichkeiten anzunehmen sind, geht deutlich aus den molaren Verhältnissen von Uronsäure : Galactosamin in ZW-Fragmenten hervor: im Gegensatz zu den äquimolaren Relationen bei Mucopolysacchariden fanden wir hier Werte zwischen 1.0 - 5.4.

In bedeutend geringerem Maße schwanken die molaren Verhältnisse des Uronsäuregehalts zu dem der Mannose. Da dieser Neutralzucker in praktisch allen untersuchten Oligosacchariden seine engen strukturellen Beziehungen zu Uronsäuren beweist, liegt die Vermutung nahe, daß auch in diesem Fall eine direkte glycosidische Bindung an Uronsäurereste vorliegt. Aufgrund der unterschiedlich hohen Relationen von Galactosamin- bzw. Mannosegehalt zum Uronsäuregehalt und der hohen Hydrolyseresistenz der daraus aufgebauten komplexeren Oligosaccharide, können Uronosylsequenzen angenommen werden, die durch Galactosamin (in Abständen von 2-3 Uronsäureresten) oder Mannose (alternierend mit Uronsäure) unterbrochen sind.

Die Fraktionierungsversuche an hochmolekularen ZW-Desaminierungsprodukten zeigten, daß auch Glucose einen integralen Bestandteil der Komplex I-Strukturregion darstellt. Die geringe Glucosekonzentration in komplexeren (Uronsäure-, Mannose- und Galactosamin-haltigen) Oligosacchariden der Partialhydrolyse spricht jedoch dafür, daß dieser Zucker größtenteils nicht direkt in die Hauptkette eingebaut ist, sondern eher über Verzweigungspunkte (Mannose oder Glucose kommen dafür in Frage) kovalent mit den übrigen Komponenten verbunden ist. Daneben konnte auch eine polymere, primär aus Glucoseresten bestehende Fraktion nach ZW-Desaminierung isoliert werden, die in Übereinstimmung mit entsprechenden, aus Partialhydrolysaten erhaltenen Oligosacchariden für das Vorliegen auch längerer Glucan-Sequenzen (Cellulose-ähnlich ?, da Jod-Jodkali-negativ) in der ZW spricht.

Die Untersuchungen der ZW-Fragmente nach desaminativer Spaltung zeigen klare Unterschiede im Strukturprinzip von Komplex I und II. Während in Komplex I Polysaccharidstränge mit nur gelegentlicher Unterbrechung durch Aminosucker vorherrschen, sind die Strukturen des Komplexes II in relativ kurzen Abständen durch Glucosamin- und Gulosaminuronsäurereste unterbrochen, so daß

bei Desaminierung niedermolekulare ZW-Bruchstücke erhalten werden. Die Oligosaccharidanalyse zeigte, daß Glucosamin mit Galactose bzw. Gulosaminuronsäure direkt verbunden vorkommt, daß aber auch Uronsäuren in diesen Strukturbereich eingebaut sind. Nicht über den gesamten Bereich von Komplex II scheinen jedoch die Uronsäuren zusammen mit der Aminouronsäure das stabilisierende Element darzustellen: wie das Auftreten von niedermolekularen, Uronsäure-freien Oligosacchariden und freiem Glucosamin in den ZW-Partialhydrolysaten andeutet, bilden Glucosamin, Galactose und Glucose miteinander relativ hydrolyse-labile Abschnitte.

Die Galactosemoleküle der ZW weisen zu etwa 1/3 eine mehrfache glycosidische Bindung auf; die Oligosaccharidanalyse von Partialhydrolysaten erbrachte neben ZW-Fragmenten, die aus den 3 ZW-Neutralsackern zusammengesetzt sind, auch komplexere Bruchstücke, die in erster Linie Bauelemente des Komplexes I, zugleich aber in geringen Mengen Galactose und Glucosamin aufwiesen. Es wäre daher gut vorstellbar, daß die Galactose-Verzweigungspunkte in Komplex II das verbindende Element zum Komplex I-Strukturbereich darstellen. Durch die Desaminierung der vorzugsweise an den Glucosamin- und Gulosaminuronsäure-Resten de-N-acetylierten ZW wird dieser Vorstellung zufolge die ZW durch Spaltung des "Brückenelements" Glucosamin → Galactose in die höhermolekularen Fragmente von Komplex I und die kleineren Komplex II-Bruchstücke zerlegt.

Obwohl wir uns darüber im Klaren sind, daß die vorhandenen Untersuchungsergebnisse nicht ausreichen, um einen widerspruchsfreien Vorschlag für die zweifellos sehr komplexe Struktur der Halococcus-ZW machen zu können, haben wir in Abbildung 15 versucht, mit Hilfe der diskutierten Strukturmerkmale ein Bild der ZW-Organisation zu entwerfen. In nur wenigen Fällen sind dabei die genaue Sequenz der Monosaccharid-Bausteine und ihre molaren Relationen zueinander durch isolierte Oligosaccharide abgesichert.

Interessant an einem solchen Strukturvorschlag scheint uns aber insbesondere zu sein, daß die miteinander kovalent verbundenen ZW-Strukturbereiche ein enges Flechtwerk aus Polysaccharidketten

bilden können, das durch H-Brückenbindungen und ionische Bindungen, wie z.B. Komplexe der Uronsäuren mit 2-wertigen Kationen, stabilisiert wird.

Der Hypothese, daß die keinem Protein zugehörigen Glycin-Bausteine der Halococcus- ZW eine dem Peptidoglycan ähnliche Quervernetzung ermöglichen, steht von unseren Befunden (vgl. Teil 1 der Diskussion) her nichts im Wege. So wäre z.B. eine kovalente Verknüpfung von Uronsäure- und Aminosuckerresten mit Hilfe von Glycin denkbar, die diesem Flechtwerk stark verzweigter Heteropolysaccharidmoleküle eine zusätzliche Stabilität verleiht. Erst genauere Bindungsanalysen können jedoch zeigen, inwieweit solche Vorstellungen tatsächlich zutreffen.

Sulfatisierte Polysaccharide wurden in breiterem Ausmaß bisher nur bei marinen Algen (Percival 1970) und höheren tierischen Organismen (Mucopolysaccharide; Jeanlos 1970) gefunden. Insbesondere unter den Algenpolysacchariden sind sulfatisierte Glycane mit Strukturpolysaccharid-Funktion bekannt. Diese sulfathaltigen Zuckerpolymere sind meist aus linearen Homoglycan-Strängen (Galactan, Fucan) oder verzweigten Heteropolysaccharid-Ketten aufgebaut, die neben verschiedenen Neutralzuckern sehr oft Uronsäurereste, jedoch keine Aminosucker enthalten.

Obwohl weder bei diesen Algen-Heteropolysacchariden noch dem Heteroglycan der Halokokken-ZW die Gesamtstruktur bekannt ist, sondern nur Strukturausschnitte zur Verfügung stehen, zeigen sich wichtige gemeinsame Prinzipien im Aufbau dieser Polymere. Dies betrifft insbesondere die verzweigt-kettige Struktur sowie die Beteiligung von Uronosylresten bei der Bildung des Heteroglycangerüsts, das aufgrund der ester-gebundenen Sulfatgruppen (Galactose-2- und 3-Sulfat wurde auch in Algenpolysacchariden wiederholt gefunden; Abdel-Fattah et al. 1974, Batey and Turvey 1975) weitere strukturelle wie auch funktionelle Beziehungen vermuten läßt.

Dennoch deutet die chemische Zusammensetzung der Halococcus-ZW (Aminosucker, Glycin als einzige Aminosäure) an, daß dieses Polymer zumindest teilweise noch andere, bei bisher untersuchten Algenpolysacchariden nicht gefundene Strukturelemente

besitzt, die in struktureller Hinsicht eine Verbindung dieser ZW zur typischen ZW-Struktur der Prokaryonten, dem Peptidoglycan denkbar erscheinen lassen.

5. Schlußbetrachtung

Aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheidet sich die Halokokken-ZW von allen bisher beschriebenen Strukturpolysacchariden. Durch seine Charakterisierung als sulfatisiertes Heteroglycan bildet dieses Polymer das erste bekannte Beispiel eines mit Sulfatgruppen veresterten bakteriellen Strukturpolysaccharids, das als Stützelement die Festigkeit der Bakterienzelle gewährleistet. In einigen wenigen Fällen wurden zwar sulfathaltige Polysaccharide bei Bakterien beschrieben, so z.B. ein Dermatansulfat-ähnliches Polymer im Kapselmateriale von Clostridium welchii (Darby et al. 1970), sowie ein Mannose- und Sulfat-haltiges Polysaccharid aus der Zellhülle von Halobacterium halobium (Konciewicz 1972); im Gegensatz zum sulfatisierten ZW-Polysaccharid von Halococcus sind diese Glycane jedoch nicht an der Bildung einer ZW-Stützstruktur beteiligt. Damit entspricht dieses Heteropolysaccharid funktionell in wesentlichen Punkten dem ZW-Heteropolymer der meisten Bakterien, dem Peptidoglycan.

Auch in struktureller Beziehung scheinen gemeinsame Verknüpfungspunkte zwischen diesen beiden Polymeren denkbar. So könnte die in allen bisher untersuchten Halokokken-Zellwänden gefundene Aminosäure Glycin in begrenztem Rahmen eine Vernetzungsfunktion zwischen den Polysaccharidketten ausüben, die im Peptidoglycan den Oligopeptiden zukommt. Die Halococcus-ZW wäre unter diesem Aspekt als eine ZW-Struktur zu betrachten, die nur noch in abgeleiteter Form gewisse Struktur-stabilisierende Prinzipien des Peptidoglycans der Bakterien erkennen läßt.

Gleichzeitig weist das ZW-Polysaccharid der Halokokken mit den sulfatisierten Strukturpolysacchariden mariner Algen wichtige Gemeinsamkeiten auf (s. Teil 4 der Diskussion).

Man könnte sich daher vorstellen, daß die Halokokken-ZW eine mögliche Zwischenstufe in der Entwicklung vom heteropolymeren Peptidoglycan der Prokaryonten zum sulfatisierten Heteroglycan der marinen Algen darstellt.

Die Funktion der Sulfatgruppen im ZW-Polysaccharid von Halococcus wird anhand der extremen physiologischen Verhältnisse, die für das Biotop dieser Organismen charakteristisch sind, erklärbar. Obwohl im physiologischen Medium und in den Zellen von extrem halophilen Bakterien gleiche osmotische Verhältnisse herrschen, ist die intrazelluläre Kationenkonzentration klar von der des umgebenden Mediums unterschieden (Lanyi 1974): während das Medium Na^+ -Ionen in einem mehr als 100-fachen Überschuß gegenüber K^+ enthält, beträgt die K^+ -Konzentration in der Bakterienzelle das 2-3fache der Na^+ -Konzentration ($> 2 \text{ m K}^+$). Gleichzeitig zeigen die bisher ausschließlich bei Halobakterien untersuchten Enzyme der extrem Halophilen größtenteils eine mehr oder weniger stark ausgeprägte K^+ -Spezifität hinsichtlich ihrer Aktivität und Stabilität (Lanyi 1974). Wie dieser für das Funktionieren des Stoffwechsels so wichtige Kationengradient zwischen Na^+ und K^+ im Inneren der Zelle gegenüber der Umgebung aufrecht erhalten wird, ist unbekannt.

Bei marinen Rotalgen konnten - in etwas abgeschwächter Form - ähnliche Unterschiede in den Kationenverhältnissen zwischen Zellinnerem und dem umgebenden Meerwasser festgestellt werden (Eppley 1958); die dabei erhaltenen Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, daß der hohe K^+ -Überschuß in der Zelle durch die vergleichsweise hohe Na^+ -Adsorptions-Selektivität eines außerhalb der Zellmembran lokalisierten, sulfathaltigen Polysaccharids (Galactansulfat) bedingt ist.

Aufgrund dieser physiologischen Ähnlichkeiten zwischen marinen Eukaryonten und extrem halophilen Prokaryonten kann sowohl bei der Halococcus-ZW wie auch bei den sulfathaltigen Lipoiden (Hancock and Kates 1973, Kates and Deroo 1973) und dem erwähnten sulfatisierten Polysaccharid (Koncewicz 1972) der Halobakterien, die Funktion der Sulfatestergruppen im selektiven Abfangen der Na^+ -Ionen gesehen werden. Mit Hilfe dieser Kationen-selektiven ZW-Struktur ist damit der Aufbau eines K^+ - bzw. Na^+ -Konzentrationsgradienten zwischen Außenmedium und dem periplasmatischen Raum der Zelle denkbar, so daß ein - wie entsprechende Untersuchungen an Halobakterien-Zellen andeuten

(Lanyi 1974) - passiver K^+ -Transport in die Bakterienzelle möglich ist. Trotz der mit dieser Vorstellung verbundenen Probleme (z.B. Regeneration der Na^+ -Form des ZW-"Kationen-austauschers") scheint uns die ZW von Halococcus ein Beispiel für strukturell wie funktionell außergewöhnliche Leistungen von Mikroorganismen in diesem "Grenzland der physiologischen Möglichkeiten" (Larsen 1973) zu sein.

E. Zusammenfassung

1. Bei 3 Stämmen der den extrem halophilen Bakterien zugehörigen Art Halococcus morrhuae wurde die qualitative und quantitative chemische Zusammensetzung der isolierten Zellwände untersucht:

Einer qualitativ übereinstimmenden chemischen Zusammensetzung in den Komponenten stehen quantitative Unterschiede zwischen den Zellwänden der einzelnen Halokokkenstämme gegenüber.

Der größte Teil des ZW-Materials besteht aus Kohlenhydraten: sie sind zusammengesetzt aus Neutralzuckern (D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose), Uronsäuren (D-Glucuronsäure, D-Galakturonsäure), Aminosuckern (Glucosamin, Galactosamin) und einer Aminouronsäure (Gulosaminuronsäure).

Nach Entfernung des geringen, den Membranproteinen zuzuordnenden Proteinanteils der Roh-ZW, bildet Glycin die einzige in der ZW vorhandene Aminosäure.

Der Anteil an anorganischem ZW-Material ist ungewöhnlich hoch. Abgesehen von den kationischen Bestandteilen (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) enthält die ZW in außerordentlich hohen Mengen Sulfat, in geringeren Mengen auch Phosphat. Diese beiden Anionen stellen echte, kovalent gebundene Komponenten der ZW dar.

Die Aminogruppen der ZW-Hexosamine sind N-acetyliert; die Carboxylgruppen der Uronsäure-Komponenten liegen unsubstituiert, d.h. als Carboxylate vor.

2. Aufgrund verschiedener Extraktionsmethoden, gel- und ionenaustausch-chromatographischer Trennungsvorgängen sowie Fraktionierungsversuchen mit löslichen ZW-Präparationen des Stammes H. morrhuae CCM 859 konnte gezeigt werden, daß die ZW von Halococcus ein Heteropolysaccharid darstellt, in dem alle Komponenten kovalent miteinander verbunden sind. Durch

die Analyse einer Reihe von ZW-Oligosacchariden konnte diese Aussage bestätigt und erhärtet werden.

3. Durch den Nachweis estergebundener Sulfatgruppen an äquatorialen sekundären Hydroxylgruppen von ZW-Zuckern wurde die Halokokken-ZW als sulfatisiertes Heteroglycan charakterisiert.
4. Mit Hilfe verschiedener ZW-Fragmentierungs- und Isolierungsverfahren konnten Oligosaccharide erhalten werden, die über die quantitative Komponentenanalyse eine Identifizierung der Uronsäuren und Galactose als sulfatisierte ZW-Zucker gestatteten; gleichzeitig erlaubte die Oligosaccharidanalyse einige wichtige Aussagen zum strukturellen Aufbau des ZW-Polysaccharids.
5. Perjodatspaltung, Analyse der Smith-Abbauprodukte und Methylierungsanalyse der ZW lieferten zusammen mit den Ergebnissen der Oligosaccharidanalyse hinreichend Beweise für folgende Substitutions- und Bindungsverhältnisse:

Die Sulfatgruppen sind weitgehend an Uronsäure-, Galactose- und Galactosaminreste der ZW (in OH-Position 2 und/ oder 3, möglicherweise auch Position 4 der Glucuronsäure) esterartig gebunden.

Glucose, Galactose, Galacturonsäure und alle Hexosamine sind im ZW-Polymer 1 → 4 glycosidisch gebunden. Mannose und Glucuronsäure sind dagegen in der Hydroxylposition 2 glycosidisch substituiert.

Glucose-, Galactose- und in geringem Maße auch Mannose sind teilweise mehrfach glycosidisch substituiert, bilden also Verzweigungspunkte des ZW-Polysaccharids. Glucosemoleküle bilden das nichtreduzierende Ende der Polysaccharidketten, so daß für die ZW eine verzweigte, sehr komplexe Struktur anzunehmen ist.

6. Anhand der vorliegenden Befunde werden Möglichkeiten des strukturellen Aufbaus und struktureller sowie funktioneller Beziehungen zu Strukturpolysacchariden anderer Organismen diskutiert.

F. Literaturverzeichnis

- Abdel-Fattah A.F., Hussein M., Salem H.M.: Some structural features of Sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*. Carboh.Res. 33, 19 (1974).
- Albersheim, P., Nevins D.J., English P.D., Karr A.: A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carboh. Res. 5, 340 (1967).
- Angyal, S.J.: Conformation of sugars. In: The Carbohydrates, Vol. I A, 195. Ed.by W.Pigman, D.Horton, New York-London: Academic Press (1972).
- Araki Y., Nakatani T., Nakayama K., Ito E.: Occurrence of N-non-substituted glucosamine residues in peptidoglycan of lysozyme-resistant cell walls from *Bacillus cereus*. J.Biol.Chem. 247, 6312 (1972).
- Archibald A.R., Baddiley J., Goundry J.: The action of dilute alkali on the glycol residues of staphylococcal peptidoglycan. Biochem.J. 116, 313 (1970).
- Aspinall G.O.: Pectins, plant gums and other plant polysaccharides. In: The Carbohydrates, Vol. II B, 515. Ed.by W. Pigman, D.Horton. New York-London: Academic Press (1970).
- Batey J.F., Turvey J.R.: The galactan sulphate of the red alga *Polysiphonia lanosa*. Carboh.Res. 43, 133 (1975).
- Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Ed.by R.E.Buchanan, N.E.Gibbons. 8.Auflage. Baltimore: Williams and Wilkins (1974).
- Bergmeyer H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim: Verlag Chemie (1974).
- Bhavanandan V.P., Meyer K.: Studies on Keratosulfates. Methylation and partial acid hydrolysis of bovine corneal keratosulfate. J.Biol.Chem. 242, 4352 (1967).

- Biely P., Jeanloz R.W.: The isolation and structure identification of Uridine 5- (2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyluronic acid pyrophosphate) from *Micrococcus lysodeikticus* cells. *J.Biol.Chem.* 244, 4929 (1969).
- Björndal H., Lindberg B., Svensson S.: Mass spectrometry of partially methylated alditolacetates. *Carboh.Res.* 5, 433 (1967).
- Björndal H., Hellerqvist C.G., Lindberg B., Svensson S.: Gasliquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. *Angew. Chem.Int.Ed.Engl.* 9, 610 (1970).
- Bleiss, W., Paul E., Göring H.: Zusammenhang zwischen Intensität der Synthese von Zellwandpolysacchariden und dem Streckungswachstum von Weizenkoleoptilen unter dem Einfluß von Wachstumsregulatoren des CCC-Typs. *Biochem.Physiol.Pflanzen (BPP)* 164, 414 (1973).
- Bligh E.G., Dyer W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37, 911 (1959).
- Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G.: New method for quantitative determination of uronic acids. *Analyt.Biochem.* 54, 484 (1973).
- Boas N.F.: Method for the determination of hexosamines in tissues. *J.Biol.Chem.* 204, 553 (1953).
- Boehringer: "Biochemica-Information". Band I und II. Boehringer-Mannheim GmbH.
- Bourne E.J., Johnson P.G., Percival E.: The water-soluble polysaccharides of *Cladophora rupestris*. IV. Autohydrolysis, Methylation of the partially desulphated material and correlation with the results from Smith degradation. *J.Chem.Soc. (C)* 1970, 1561.

- Brown A.D., Cho K.Y.: The walls of extremely halophilic cocci: Gram-positive bacteria lacking muramic acid. *J.Gen. Microbiol.* 62, 267 (1970).
- Brown A.D., Shorey C.D.: The cell envelope of two extremely halophilic bacteria. *J.Cell.Biol.* 18 681 (1963).
- Chatterjee A.N.: Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of *Staphylococcus aureus*. *J.Bact.* 98, 519 (1969).
- Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H.: Microdetermination of phosphorus. *Analyt.Chem.* 28, 1756 (1956).
- Choi H.U., Meyer K.: The structure of a sulfated glycoprotein of chick allantoic fluid: Methylation and periodate oxidation. *Carboh.Res.* 40, 77 (1975).
- Cifonelli J.A.: Reaction of heparitin sulfate with nitrous acid. *Carboh.Res.* 8, 233 (1968).
- Cifonelli J.A., Dorfman A.: Properties of heparin monosulfate (Heparitin monosulfate). *J.Biol.Chem.* 235, 3283 (1960).
- Clotten R., Clotten A.: Hochspannungslektrophorese. Stuttgart: Thieme Verlag (1962).
- Corey E.J., Chaykovsky M.: Methylsulfinylcarbanion. *J.Americ. Chem.Soc.* 84, 866 (1962).
- Danishesky I., Whistler R.L., Bettelheim F.A.: Introduction to polysaccharide chemistry. In: *The Carbohydrates*, Vol.II A, 375. Ed. by W.Pigman, D.Horton. New York-London: Academic Press (1970).
- Darby G.K., Jones A.S., Kennedy J.F., Walker R.T.: Isolation and analysis of the nucleic acids and polysaccharides from *Clostridium welchii*. *J.Bact.* 103, 159 (1970).
- Dische Z., Borenfreund E.: A spectrophotometric method for the microdetermination of hexosamines. *J.Biol.Chem.* 184, 517 (1950).

- Dodgston K.S., Price R.G.: A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem.J.*84, 106 (1962).
- Eisenberg F. jr.: Gaschromatographic assay of iduronic and glucuronic acids as aldonic acid butaneboronates. *Analyt.Biochem.*60, 181 (1974).
- Eppley R.W.: Sodium exclusion and potassium retention by the red marine alga, *Porphyra perforata*. *J.Gen.Physiol.*41, 901 (1958).
- Ernst W.: Dünnschichtchromatographische Trennung und Bestimmung von Uronsäuren und Uronsäurelactonen. *Anal.Chim.Acta*40, 161 (1968).
- Fischer F.G., Nebel H.J.: Nachweis und Bestimmung von Glucosamin und Galactosamin auf Papierchromatogrammen. *Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.*302, 10 (1955).
- Fraenkel-Conrat H., Chun Ming Tsung: Hydrazinolysis. In: *Methods in Enzymology*, Vol. XI, 151. Ed. by S.P.Colowick, N.O. Kaplan. London-New York: Academic Press (1967).
- Fransson L.A.: Periodate oxydation of L-Iduronic acid residues in dermatan sulfate. *Carboh.Res.*36, 339 (1974).
- Galambos J.T.: The reaction of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars. *Anal.Biochem.*19, 119 (1967).
- Galanos C., Lüderitz O.: Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms. *Eur.J. Biochem.*54, 603 (1975).
- Ghuysen J.M., Strominger J.L.: Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. I. Preparation of fragments by enzymatic hydrolysis. *Biochemistry*2, 1110 (1963).
- Gmeiner J., Lüderitz O., Westphal O.: Biochemical studies on lipopolysaccharides of *Salmonella R* mutants. 6. Investigations on the structure of the lipid A component. *Eur.J.Biochem.*7, 370 (1969).

- Gochnauer M.B., Kushwaha S.C., Kates M., Kushner D.J.:
Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria. Arch.Mikrobiol. 84, 339 (1972).
- Grado C., Ballou C.E.: Myo-inositol phosphates obtained by alkaline hydrolysis of beef brain phosphoinositide. J.Biol.Chem. 236, 54 (1961).
- Hakomori S.: A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J.Biochem. 55, 205 (1964).
- Hancock A.J., Kates M.: Structure determination of the phosphatidylglycerosulfate (diether analog) from Halobacterium cutirubrum. J.Lipid Res. 14, 422 (1973).
- Heath E.C.: Complex Polysaccharides. Ann.Rev.Biochem. 40, 29 (1971).
- Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E.: Chemical analysis of microbial cells. In: Methods in Microbiology, Vol.5 B, 209. Ed.by J.R.Norris, D.W.Ribbons. London - New York: Academic Press (1971).
- Hestrin S.: The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. J.Biol.Chem. 180, 249 (1949).
- Heymann H., Manniello J.M., Barkulis S.S.: Structure of streptococcal cell walls. III. Characterization of an alanine-containing glucosaminylmuramic acid derivative liberated by lysozyme from streptococcal glycopeptide. J.Biol.Chem. 239, 2981 (1964).
- Hoffman J., Lindberg B., Svensson S.: Determination of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. Acta Chem.Scand. 26, 661 (1972).
- Höök M., Lindahl U., Iverius P.-H.: Distribution of sulphate and iduronic acid residues in heparin and heparan sulphate. Biochem.J. 137, 33 (1974).

- Inoue S., Miyawaki M.: Quantitative analysis of iduronic acid and glucuronic acid in sulfated galactosamino-glycuronans by gas chromatography. *Anal.Biochem.* 65, 164 (1975).
- Ishak M.F., Painter T.: The origin of the periodate-resistant D-glucose residues in starches and glycogenes. *Carboh.Res.* 32, 227 (1974).
- Jeanloz R.W.: Mucopolysaccharides of higher animals. In: *The Carbohydrates*, Vol. II B, 589. Ed. by W.Pigman, D.Horton. New York - London: Academic Press (1970).
- Jeffrey P.L., Rienits K.G.: An improved method for the isolation of hexuronic acid from chondroitin sulfate preparations. *Biochim.Biophys.Acta* 141, 179 (1967).
- Johnson A.R.: Improved method of hexosamine determination. *Anal. Biochem.* 44, 628 (1971).
- Jones, T.M., Albersheim P.: A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49, 926 (1972).
- Jorpes J.E., Boström H., Mansson B.: On the linkage of the amino group in heparin. *Acta Chem. Scand.* 6, 797 (1952).
- Kantor T.G., Schubert M.: A method for the desulfation of chondroitin sulfate. *J.Americ.Chem.Soc.* 79, 152 (1957).
- Kates, M., Deroo P.W.: Structure determination of the glycolipid sulfate from the extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. *J.Lipid Res.* 14, 438 (1973).
- Kawai Y., Seno N., Anno K.: A modified method for chondrosulfatase assay. *Anal.Biochem.* 32, 314 (1969).
- Kidby D.K., Davidson D.J.: A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal. Biochem.* 55, 321 (1973).
- Kocur M., Smid B., Martinec T.: The fine structure of extreme halophilic cocci. *Microbios* 5, 101 (1972).

- Kocur M., Boháček J.: DNA base composition of extremely halophilic cocci. Arch.Mikrobiol. 82, 280 (1972).
- Konieczny M.: The presence of a sulphated polysaccharide in the cell envelopes of Halobacterium halobium. Biochem. J. 130, 40p (1972).
- Krause R.M., McCarty M.: Studies on the chemical structure of the streptococcal cell wall. I. The identification of a mucopeptide in the cell walls of groups A and A-variant streptococci. J.Exp.Med. 114, 127 (1961).
- Kushner D.J., Onishi H.: Absence of normal wall constituents from the outer layers of Halobacterium cutirubrum. Canad.J.Biochem.46, 997 (1968).
- Kushwaha S.C., Gochnauer M.B., Kushner D.J., Kates M.: Pigments and isoprenoid compounds in extremely and moderately halophilic bacteria. Canad.J.Microbiol. 20, 241 (1973).
- Lagunoff D., Warren G.: Determination of 2-deoxy-2-sulfoamino-hexose content of mucopolysaccharides. Arch.Biochem. Biophys.99, 396 (1962).
- Lanyi J.K.: Salt-dependent properties from extremely halophilic bacteria. Bacteriol.Rev. 38, 272 (1974).
- Larsen H.: The halobacteria's confusion to biology. Antonie van Leeuwenhoek 39, 383 (1973).
- Lindberg B., Lönngren J., Svensson S.: Specific degradation of polysaccharides. In: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol.31, 185. Ed.by R.S. Tipson, D.Horton. New York - San Francisco - London: Academic Press (1975).
- Lloyd A.G., Dodgston K.S., Price R.G., Rose F.A.: Infrared studies on sulphate esters. I. Polysaccharide sulphates. Biochim.Biophys.Acta 46, 108 (1961).
- Mayer H.: D-Mannosaminuronsäure-Baustein des K 7 - Antigens von Escherichia coli. Eur.J.Biochem.8, 139 (1969).

- Mayer H., Framberg K., Weckesser J.: 6-O-Methyl-D-Glucosamine in lipopolysaccharides of *Rhodopseudomonas palustris* strains. *Eur.J.Biochem.* 44, 181 (1974).
- Merck-Broschüre: "Biochemica - Enzyme". Merck-Darmstadt.
- Methods in Enzymology Vol. VIII: Complex Carbohydrates. Ed.by E.F.Neufeld, V.Ginsburg. New York - London: Academic Press (1966).
- Mirelman D., Lotan R., Bernstein Y., Flowers H.M., Sharon N.: Purification and properties of an extracellular polysaccharide containing amino sugars formed by *Bacillus cereus*. *J.Gen.Microbiol.* 77, 5 (1973).
- Miyaji H., Misaki A.: Distribution of sulfate groups in the partially sulfated dextrans. *J.Biochem.* 74, 1131 (1973)
- Morikawa H., Tanizawa K., Senda M.: Infrared spectra of *Nitella* cell walls and orientation of carboxylate ions in the walls. *Agr.Biol.Chem.* 38, 243 (1974).
- Nunn J.R., Parolis H.: Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part IV. Methylation analysis of Phyllymenan and desulphated Phyllymenan. *Carboh. Res.* 14, 145 (1970).
- Oesterhelt D., Stoeckenius W.: Rhodopsin like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biol.* 233, 149 (1971).
- Partridge S.M.: Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature* 164, 443 (1949).
- Pavlik J.G., Rogers H.J.: Selective extraction of polymers from cell walls of gram-positive bacteria. *Biochem.J.* 131, 619 (1973).
- Pazur J.H.: Oligosaccharides. In: *The Carbohydrates*, Vol.II A, 69. Ed.by W.Pigman, D.Horton. New York - London: Academic Press (1970).
- Percival E.: Glucuronoxylfucan, a cell-wall component of *Ascophyllum nodosum*. *Carboh.Res.* 7, 272 (1968).

- Percival E.: Algal polysaccharides. In: The Carbohydrates. Vol. II B, 537. Ed. by W.Pigman, D.Horton. New York - London : Academic Press (1970).
- Perkins H.R.: A polymer containing glucose and aminohexuronic acid isolated from the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem.J.* 86, 475 (1963).
- Rees D.A.: Estimation of the relative amounts of isomeric sulfate esters in some sulfated polysaccharides. *J. Chem.Soc.* 1961, 5168.
- Rees D.A.: A note on the characterization of carbohydrate sulfates by acid hydrolysis. *Biochem.J.* 88, 343 (1963).
- Reissig J.L., Strominger J.L., Leloir L.F.: A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J.Biol.Chem.* 217, 959 (1955).
- Reistad R.: On the composition and nature of the bulk protein of extremely halophilic bacteria. *Arch.Mikrobiol.* 71, 353 (1970).
- Reistad R.: Cell wall of an extremely halophilic coccus. Investigation of ninhydrin-positive compounds. *Arch.Mikrobiol.* 82, 24 (1972).
- Reistad R.: 2-Amino-2-deoxyguluronic acid: a constituent of the cell wall of *Halococcus* sp., strain 24. *Carboh.Res.* 36, 420 (1974).
- Reistad R.: Amino sugar and amino acid constituents of the cell walls of the extremely halophilic cocci. *Arch. Microbiol.* 102, 71 (1975).
- Reske K.: Strukturchemische Untersuchungen am O-antigenen Polysaccharid von *Escherichia coli* 08 : K 27⁻ : H⁻. Dissertation. Universität Freiburg (1973).
- Romanovska E., Reihold V.: 2-Amino-2-deoxyhexuronic acid. Constituent of *Shigella sonnei* Phase I lipopolysaccharide. *Eur.J.Biochem.* 36, 160 (1973).
- Roy A.B., Trudinger P.A.: The biochemistry of inorganic compounds of sulphur. Cambridge: University press (1970).

- Schleifer K.H., Kandler, O.: Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von *S.thermophilus* and *S.faecalis* Arch.Mikrobiol. 57, 335 (1967).
- Schleifer K.H., Kandler, O.: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol.Rev. 36, 407 (1972).
- Scott, J.E.: Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. In: Methods in carbohydrate chemistry Vol. 5, 38. Ed. by R.L.Whistler. New York - London: Academic Press (1965).
- Sentandreu R., Northcote D.H.: The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall. Biochem.J.109, 419 (1968).
- Shaw D., Moss G.W.: Quantitative estimation of neutral sugars by gas-liquid chromatography. J.Chromatogr.41, 350 (1969).
- Shively J.E., Conrad H.E.: Stoichiometry of the nitrous acid deaminative cleavage of model amino sugar glycosides and glycosaminoglycuronans. Biochemistry 9, 33 (1970)
- Spiro R.G.: Charakterization of carbohydrate units of glycoproteins. In: Methods in Enzymology, Vol.VIII, 26. Ed.by E.F.Neufeld, V.Ginsburg. New York - London: Academic Press (1966).
- Sreenivasan A., Venkataraman R.: Media for the study of red halophilic bacteria. J.Sci.and Ind.Res.15C, 210 (1956).
- Stellner K., Saito H., Hakomori S.: Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. Aminosugar linkages of ceramide pentasaccharides of rabbit erythrocytes and of Forssman antigen. Arch.Biochem. Biophys.155, 464 (1973).
- Stoffyn P.J.: Ninhydrin degradation of hexosamines and periodic acid oxidation of hexoses. J.Org.Chem.24, 1360 (1959)

- Stoolmiller, A.C., Dorfman A.: The metabolism of glycosamino-
glycans. In: Comprehensive Biochemistry, Vol.17, 241.
Ed. by M.Florkin, E.H. Stotz.Amsterdam - London -
New York: Elsevier (1969).
- Takebe I.: Extent of cross linkage in the murein sacculus of
Escherichia coli B cell wall. *Biochim.Biophys.Acta*
101, 124 (1965).
- Taylor R.L., Conrad H.E.: Stoichiometric depolymerization of
polyuronides and glycosaminoglycuronans to mono-
saccharides following reduction of their carbodiimide-
activated carboxyl groups. *Biochemistry* 11, 1383
(1972).
- Terho T., Hartiala K.: Method for determination of the sulfate
content of glycosaminoglycans. *Analyt.Biochem.*
41, 471 (1971).
- Torii M., Sakakibara K., Kuroda K.: Occurrence of 2-amino-2-deoxy-
hexuronic acids as constituents of *Vibrio parahaemo-*
lyticus K 15 antigen. *Eur.J.Biochem.*37, 401 (1973).
- Trevelyan W.E., Procter D.D., Harrison J.S.: Detection of sugars
on paperchromatograms. *Nature* 166, 444 (1950).
- Wessler E.: The nature of the non-ultrafilterable glycosamino-
glycans of normal human urine. *Biochem.J.*122,
373 (1971).
- Wheat R.W.: Analysis of hexosamines in bacterial polysaccharides
by chromatographic procedures. In: *Methods in Enzymo-*
logy, Vol. VIII, 60. Ed.by E.F.Neufeld, V.Ginsburg,
New York - London: Academic Press (1966).

Die vorgelegte Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof.Dr.K.H.Schleifer von 1973 bis 1976 angefertigt.

Herrn Professor Schleifer danke ich für sein reges Interesse, seine vielseitigen Anregungen und wertvolle Unterstützung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern am Botanischen Institut der Universität München.

Frau L. Hagner danke ich für ihre freundliche Hilfe und sorgfältige Assistenz.

Herrn Dr.Rosopulo und Frau Hahn von der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau danke ich für die Durchführung der Asche-Rückstandsanalysen.

Herrn Dr.K.Lindemann danke ich für die Aufnahme eines Teils der IR-Spektren.

Herrn H.Reitmeier danke ich für die Analyse der Zellpigmente.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit (Methylierungsanalyse) wurde während eines Aufenthalts am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg i.Br. durchgeführt.

Frau Dr.I.Fromme und Herrn Dr.H.Mayer bin ich für ihre Hilfe und wertvollen Ratschläge bei der Methylierungsanalyse zu großem Dank verpflichtet.

Weiterhin danke ich Dr.S.Hase, D.Borowiak und Dr.E.Th. Rietschel für ihre freundliche Anleitung und Hilfe.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 29.5.1947 wurde ich, Josef Steber, als Sohn des Bäckermeisters Hans Steber und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Mackenbrock in Regensburg geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Abensberg und anschließend das St. Michaels-Gymnasium der Benediktiner in Metten. Dort legte ich im Juni 1966 die Reifeprüfung ab.

Vom Oktober 1966 bis September 1968 leistete ich meinen Wehrdienst in Regensburg ab.

Vom Wintersemester 1968/69 an studierte ich Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München und legte hier im Wintersemester 1972/73 die Diplomhauptprüfung für Biologen ab.

Im März 1973 begann ich unter der Anleitung von Prof.Dr.K.H. Schleifer mit der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Während dieser Zeit hatte ich eine Stelle als wissenschaftliche Hilfskraft inne, die von März 1973 bis März 1974 von der Universität, von April 1974 bis März 1976 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert wurde.

Seit April 1976 bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München tätig.

